



Ana Mafalda Batarda Simão Lopes Ramos

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de uma Metodologia Analítica de
Dissolução para a Quantificação do
Telmisartan, por HPLC, para a determinação
do Fator de Similaridade em Comprimidos de
Telmisartan/Hidroclorotiazida**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Química e Bioquímica

Orientadora: Dra. Adriana Leite, Sofarimex – Indústria
Química e Farmacêutica, S.A.

Co-orientador: Professor Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira, FCT-UNL

Arguente: Dr. Fausto Piriquito Sofarimex – Indústria Química e
Farmacêutica, S.A.

Vogal: Dra. Adriana Leite, Sofarimex – Indústria Química e
Farmacêutica, S.A.



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Setembro de 2016

Ana Mafalda Batarda Simão Lopes Ramos

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de uma Metodologia Analítica de
Dissolução para a Quantificação do
Telmisartan, por HPLC, para a determinação
do Fator de Similaridade em Comprimidos de
Telmisartan/Hidroclorotiazida**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Química e Bioquímica

Orientadora: Dra. Adriana Leite, Sofarimex – Indústria
Química e Farmacêutica, S.A.

Co-orientador: Professor Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira, FCT-UNL

Arguente: Dr. Fausto Piriquito, Sofarimex – Indústria Química e
Farmacêutica, S.A.

Vogal: Dra. Adriana Leite, Sofarimex – Indústria Química e
Farmacêutica, S.A.

Setembro de 2016

Validação de uma Metodologia analítica de dissolução para a Quantificação do Telmisartan, por HPLC, para a Determinação do Fator de Similaridade em Comprimidos de Telmisartan/Hidroclorotiazida

Copyright © Ana Mafalda Batarda Simão Lopes Ramos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Grupo Azevedos pela disponibilização de todos os meios técnicos, sem os quais não teria sido possível a realização desta dissertação.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Adriana Leite, por todos os conhecimentos transmitidos bem como todo o apoio e disponibilidade, e claro, por toda a paciência e ajuda no decorrer deste trabalho.

Ao professor Mário Eusébio, agradeço a motivação que sempre me transmitiu, a constante disponibilidade bem como os valiosos conselhos prestados ao longo deste trabalho e sem os quais a realização do mesmo não teria sido possível.

A toda a equipa do DID: à Ana, à Elsinha, à Luísa, ao Luís, à Rosário e à Sara. Agradeço todos conhecimentos transmitidos, todo apoio dispensado e a constante preocupação, mas, acima de tudo, pela boa disposição e por todas as palavras de conforto nos momentos de maior *stress*. Obrigada por terem sido as picolinas mais queridas que pode existir e por me terem recebido tão bem.

E como sem ti esta experiência não tinha sido a mesma coisa, um enorme e sincero agradecimento à Cátia pelo companheirismo, amizade, boa disposição, apoio e incentivo permanentes ao longo destes 6 meses.

À Diana, à Carolina e à Joana, por serem as melhores amigas que se pode ter.

Ao meu pico, um agradecimento especial, pela amizade, amor e apoio incondicionais que sempre me incentivaram a nunca desistir, mas, principalmente, pela compreensão demonstrada.

Aos meus irmãos, à minha tia, às minhas avós e à Rita por todo o apoio e conselhos e, acima de tudo, por serem a melhor família que podia ter.

E como os últimos são os primeiros, aos mais importantes e a quem devo muito, os meus pais, um agradecimento gigante por tudo o que fizeram por mim. Pelo apoio, força e incentivo permanentes, imprescindíveis e fundamentais na motivação, realização e conclusão deste trabalho.

RESUMO

Nos últimos anos, tem aumentado o número de medicamentos genéricos disponíveis no mercado. Sendo a bioequivalência um dos principais requisitos a sustentar a utilização segura e eficaz destes medicamentos torna-se importante maximizar a probabilidade de sucesso dos estudos de bioequivalência recorrendo a estudos de dissolução *in vitro*.

O presente trabalho integra-se num projeto que se tem vindo a desenvolver na Sofarimex e teve como objetivo a validação de um método analítico de quantificação do telmisartan em ensaios de dissolução, por cromatografia líquida de alta eficiência. Este método foi posteriormente aplicado num estudo comparativo entre os perfis de dissolução do medicamento teste (telmisartan/hidroclorotiazida) e do medicamento de referência (Micardis Plus®) de forma a selecionar o lote teste mais adequado a ser submetido a um estudo *in vivo*. Para tal, foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão e, posteriormente, foi avaliada a similaridade entre os lotes do medicamento teste e do medicamento referência através do cálculo do fator de similaridade (f_2).

Os resultados mostraram que o método é específico e que é linear para uma gama de trabalho entre 8,91 e 53,49 µg/mL. Relativamente aos parâmetros de repetibilidade e precisão intermédia, o método apresentou coeficientes de variação abaixo dos limites definidos. Na avaliação da exatidão do método foram obtidas percentagens de recuperação entre 95% e 105% para todos os níveis de concentração. Uma vez que todos os parâmetros cumpriram os critérios definidos, o método foi validado.

Foram realizados perfis de dissolução nos meios HCl 0,1 N pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,5. De acordo com os resultados obtidos apenas foi verificada a similaridade dos dois produtos nos meios de dissolução com pH 6,8 e pH 7,5, sugerindo que o medicamento teste não será bioequivalente ao medicamento de referência.

Palavras-chave: Bioequivalência, Telmisartan, Validação, HPLC, Perfis de dissolução

ABSTRACT

In the last years, the available number of generic medicines in the market has increased. Being bioequivalence one of the main principles underpinning the safe and effective use of generic medicines, it is important to maximize the chances of success of the bioequivalence study using *in vitro* dissolution studies.

The present study is framed within a research program, taking place at Sofarimex, with the objective of validation an analytical quantification methodology for telmisartan in dissolution tests, by high performance liquid chromatography. This method was then applied in a comparative study between the dissolution profiles of the medicine under study and the reference product (Micardis Plus®) in order to select an appropriate batch of the test product to be subjected to an *in vivo* study. For this, specificity, linearity, repeatability, intermediate precision and accuracy were evaluated and, furthermore, similarity between test batches and reference product were evaluated by calculating the similarity factor (f_2).

The results showed that the method is specific and linear in a range of concentrations from 8,91 and 53,49 µg/mL. Relatively to repeatability and intermediate precision parameters, the method showed coefficients of variation within the specified limits. In the accuracy's evaluation, recovery rates between 95% and 105% were obtained. Once all parameters had met the criteria, the method was validated.

Dissolution profiles were carried out in 0,1 N HCl pH 1,2, acetate buffer pH 4,5, phosphate buffer pH 6,8 and phosphate buffer pH 7,5. According to the results, the similarity between the test drug and Micardis Plus® (reference product) was only verified in the dissolution medias with pH 6,8 and pH 7,5, suggesting that the test product won't be bioequivalent to the reference product.

Keywords: Bioequivalence, Telmisartan, Validation, HPLC, Dissolution profiles

Índice

1.	ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	1
2.	GRUPO AZEVEDOS	3
2.1	Sofarimex	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	Medicamentos Genéricos	5
3.1.1	Medicamentos Genéricos na Europa	6
3.1.2	Biodisponibilidade	6
3.1.3	Bioequivalência	6
3.2	Genéricos no Tratamento de Doenças Cardiovasculares	7
3.2.1	Telmisartan/Hidroclorotiazida	7
3.2.2	Telmisartan	8
3.3	Dissolução de Fármacos	10
3.3.1	Evolução Histórica	10
3.3.2	Aplicação dos Ensaio de Dissolução	12
3.3.3	Desenvolvimento de um Teste de Dissolução	15
3.3.4	Comparação Perfis de Dissolução	16
3.3.5	Aparelho de Dissolução	17
3.4	Fatores que Influenciam a Dissolução	18
3.4.1	Fatores relacionados com o fármaco e com a formulação	19
3.4.2	Fatores relacionados com o ensaio de dissolução	23
3.4.3	Fatores relacionados com a forma farmacêutica	26
3.5	Correlações <i>In Vitro-In Vivo</i>	26
3.6	Sistema de Classificação Biofarmacêutica	27
3.7	Métodos Cromatográficos	28
3.7.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	28
3.8	Validação de Métodos	30
3.8.1	Gama de Trabalho	31
3.8.2	Linearidade	31
3.8.3	Especificidade	32
3.8.4	Precisão	32

3.8.5	Exatidão	33
3.8.6	Estabilidade	34
4.	DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
4.1	Composição do Medicamento Teste.....	36
4.2	Reagentes	36
4.3	Material	36
4.4	Equipamento	37
4.5	Métodos	37
4.5.1	Dissolução	37
4.5.2	Doseamento	43
4.5.3	Validação do Método Analítico para os estudos dos perfis de dissolução	45
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	49
5.1	Validação do Método Analítico.....	49
5.1.1	Especificidade	49
5.1.2	Linearidade e Gama de Trabalho.....	52
5.1.3	Precisão.....	54
5.1.4	Exatidão.....	57
5.1.5	Estabilidade	57
5.2	Resultados dos Ensaio de Dissolução	58
5.2.1	Meio de Dissolução: HCl 0,1 N (pH 1,2)	58
5.2.2	Meio de Dissolução: tampão acetato (pH 4,5)	63
5.2.3	Meio de Dissolução: tampão fosfato (pH 6,8)	67
5.2.4	Meio de Dissolução: tampão fosfato (pH 7,5)	71
6.	CONCLUSÕES	77
7.	BIBLIOGRAFIA.....	79

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Distribuição de produtos na Sofarimex	4
Figura 3.1 - Conceito de comprimidos bicamada, Adaptado [22]	8
Figura 3.2 – Estrutura química telmisartan	9
Figura 3.3 - Esquema do processo de absorção, Adaptado [37].....	13
Figura 3.4 - Aparelho de Dissolução com Pá Giratória (dimensões em milímetros), [48]	18
Figura 3.5 - Representação esquemática de um tensioativo, [57].....	21
Figura 3.6 - Representação esquemática do lauril sulfato de sódio, [57]	23
Figura 3.7 - Valores Médios de pH em Humanos Saudáveis em Jejum/Após Alimentação ao longo do Trato Gastrointestinal, Adaptado [65]	24
Figura 3.8 - Aparelho de HPLC, [77]	29
Figura 4.1 - Aparelho Utilizado nos Ensaios de Dissolução	38
Figura 4.2 - Balança Micro Analítica Utilizada na Pesagem dos Padrões.....	40
Figura 4.3 - Frascos para Recolha das Amostras.....	40
Figura 4.4 - Diluição das Amostras Retiradas de cada Copo nos Diferentes Tempos de Recolha	41
Figura 4.5 – Comprimidos Pulverizados	44
Figura 4.6 - Amostras a serem centrifugadas	44
Figura 5.1 - Cromatograma correspondente à fase móvel	49
Figura 5.2 - Cromatograma correspondente ao meio de dissolução do telmisartan, pH=7,5	49
Figura 5.3 - Cromatograma correspondente ao solvente A	50
Figura 5.4 - Cromatograma correspondente à solução placebo pH=7,5.....	50
Figura 5.5 - Cromatograma correspondente à solução padrão (80/25 mg TEL/HCTZ) pH=7,5	51
Figura 5.6 - Cromatograma correspondente à solução amostra (80/25 mg TEL/HCTZ) pH=7,5	51
Figura 5.7 - Reta de calibração do Telmisartan	52
Figura 5.8 - Distribuição residual.....	53
Figura 5.9 - Perfil de dissolução do telmisartan em HCl 0,1 N pH 1,2 para as formulações teste e para o produto de referência (Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ).....	59
Figura 5.10 - Perfil de dissolução do telmisartan em HCl 0,1 N pH 1,2 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ).....	61
Figura 5.11 - Perfil de dissolução do telmisartan em HCl pH 1,2 na dosagem 40/12,5 TEL/HCTZ para as formulações teste e para o produto de referência (Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ) .	62
Figura 5.12 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão acetato pH 4,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ).....	64
Figura 5.13 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão acetato pH 4,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ).....	65
Figura 5.14 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão acetato pH 4,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ).....	67

Figura 5.15 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 6,8 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ).....	68
Figura 5.16 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 6,8 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ).....	70
Figura 5.17 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 6,8 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ).....	71
Figura 5.18 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 7,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ).....	72
Figura 5.19 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 7,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ).....	73
Figura 5.20 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 7,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ).....	74

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Solubilidade das substâncias, [48].....	19
Tabela 3.2 – Excipientes Utilizados na formulação teste e referência	22
Tabela 3.3 - Fatores Relacionados com o Ensaio que Afetam a Taxa de Dissolução.....	23
Tabela 3.4 - Valores Médios de pH em Humanos Saudáveis em Jejum/Após Alimentação ao longo do Trato Gastrointestinal	24
Tabela 3.5 - Biodisponibilidade das Diferentes Formas Farmacêuticas.....	26
Tabela 3.6 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica, Adaptado de [74]	27
Tabela 3.7 – Exigências de Validação de Métodos Analíticos de Acordo com a ICH.....	31
Tabela 4.1 - Lotes estudados.....	35
Tabela 4.2 - Composição Comprimidos Telmisartan/Hidroclorotiazida	36
Tabela 4.3 – Condições Experimentais dos Ensaios de Dissolução	38
Tabela 4.4 – Preparação dos Meios de Dissolução.....	41
Tabela 4.5 – Gradiente Fase Móvel Ensaio Dissolução	42
Tabela 4.6 - Gradiente Fase Móvel Ensaio Doseamento	44
Tabela 4.7 – Níveis de Concentração para o Estudo da Linearidade (formulação 80/25 mg TEL/HCTZ)	45
Tabela 4.8 - Níveis de Concentração para o Estudo da Exatidão	47
Tabela 5.1 - Concentração do padrão e média dos respectivos sinais instrumentais	52
Tabela 5.2 - Resultados do ensaio de linearidade (formulação 80/25 mg TEL/HCTZ)	53
Tabela 5.3 – Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade do equipamento	54
Tabela 5.4 – Repetibilidade do Método para a formulação 80/25 mg	55
Tabela 5.5 - Repetibilidade do Método para a formulação 40/12,5 mg	55
Tabela 5.6 – Precisão intermédia do ensaio para a formulação 80/25 mg TEL/HCTZ	56
Tabela 5.7 - Precisão intermédia do ensaio para a formulação 40/12,5 mg TEL/HCTZ	56
Tabela 5.8 - Resultados para o ensaio de exatidão.....	57
Tabela 5.9 - Resumo dos resultados obtidos para o ensaio de estabilidade do telmisartan	57
Tabela 5.10 – Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/25 mg em HCl 0,1 N pH 1,2	59
Tabela 5.11 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/25 mg em HCl 0,1 N pH 1,2.....	59
Tabela 5.12 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/12,5 mg em HCl 0,1 N pH 1,2	60
Tabela 5.13 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/12,5 mg em HCl pH 1,2	61
Tabela 5.14 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 40/12,5 mg em HCl 0,1 N pH 1,2	62
Tabela 5.15 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 40/12,5 mg em HCl pH 1,2	62

Tabela 5.16 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/25 mg em tampão acetato pH 4,5	63
Tabela 5.17 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/25 mg em tampão acetato pH 4,5	64
Tabela 5.18 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/12,5 mg em tampão acetato pH 4,5	65
Tabela 5.19 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/12,5 mg em tampão acetato pH 4,5	65
Tabela 5.20 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 40/12,5 mg em tampão acetato pH 4,5	66
Tabela 5.21 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 40/12,5 mg em tampão acetato pH 4,5	67
Tabela 5.22 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/25 mg em tampão fosfato pH 6,8	68
Tabela 5.23 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/25 mg em tampão fosfato pH 6,8	68
Tabela 5.24 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/12,5 mg em tampão fosfato pH 6,8	69
Tabela 5.25 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 40/12,5 mg em tampão fosfato pH 6,8	70
Tabela 5.26 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/25 mg em tampão fosfato pH 7,5	71
Tabela 5.27 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/12,5 mg em tampão fosfato pH 7,5	72
Tabela 5.28 - Valores médios de percentagem dissolvida do telmisartan na dosagem 40/12,5 mg em tampão fosfato pH 7,5	73

Índice de Equações

Equação 3.1 - Equação Noyes–Whitney	10
Equação 3.2	11
Equação 3.3	11
Equação 3.4	11
Equação 3.5	16
Equação 3.6	16
Equação 3.7 - Efeito do pH na ionização de ácidos	20
Equação 3.8 - Efeito do pH na ionização de bases	20
Equação 3.9	34
Equação 4.1	42
Equação 4.2 – Concentração real de padrão	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	Autorização de Introdução do Mercado
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> /Substância Ativa
BA	<i>Bioavailability</i> /Biodisponibilidade
BD/BE	Biodisponibilidade/Bioequivalência
BCS	<i>Biopharmaceutics Classification System</i> /Sistema de Classificação Biofarmacêutica
BE	Bioequivalência
CIVIV	Correlação <i>In Vitro-In Vivo</i>
CV	Coeficiente de Variação
CQ	Controlo Qualidade
DCV	Doenças Cardiovasculares
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DP	Desvio Padrão
EMA	<i>European Medicines Agency</i> /Agência Europeia de Medicamentos
HCTZ	Hidroclorotiazida
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> /Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
I&D	Investigação & Desenvolvimento
LC	<i>Liquid Chromatography</i> /Cromatografia Líquida
MG	Medicamentos Genéricos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
RAS	<i>Renin-Angiotensin System</i> /Sistema Renina-Angiotensina
RELA	Regulamento de Licenciamento da Atividade Industrial
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> /Desvio Padrão Relativo
SLS	<i>Sodium Lauryl Sulphate</i> /Lauril Sulfato de Sódio
TEL	Telmisartan
TGI	Trato Gastrointestinal
TR	Tempo de Retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> /Farmacopeia dos Estados Unidos

1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

A preocupação inerente aos custos dos cuidados de saúde resultou num grande aumento da utilização de produtos genéricos. Cerca de metade de todas as prescrições para medicamentos de referência podem ser substituídas por prescrições de medicamentos genéricos. Com a crescente disponibilidade e uso deste tipo de medicamentos, os profissionais de saúde são confrontados com um leque cada vez maior de possíveis alternativas aos medicamentos de referência. O crescimento do mercado dos genéricos e o aumento do número de medicamentos genéricos disponíveis tem solicitado algumas perguntas entre muitos profissionais de saúde e cientistas sobre a equivalência terapêutica entre os medicamentos de referência e medicamentos genéricos, nomeadamente em medicamentos de algumas categorias, como é o caso de medicamentos para o tratamento de doenças do foro cardiovascular tais como os anti hipertensores, objeto deste estudo [1].

Os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência (BD/BE) constituem a peça fulcral da avaliação de um medicamento genérico e são necessários para medicamentos genéricos destinados a exercer a sua ação por via sistémica após absorção oral, como é o caso dos comprimidos [2, 3]. Segundo o INFARMED, dois medicamentos são considerados bioequivalentes se são equivalentes farmacêuticos (se contêm a mesma quantidade da(s) substância(s) ativa(s) na mesma forma farmacêutica de acordo com padrões iguais ou semelhantes aos do medicamento de referência) e se as suas biodisponibilidades (velocidade e grau com que uma substância ativa é absorvida para a circulação sanguínea a partir da forma farmacêutica administrada e se torna disponível no local de ação), após administração na mesma dose molar, são tão semelhantes que os seus efeitos, tanto no que diz respeito à sua eficácia como à sua segurança, serão essencialmente os mesmos [4]. Por outras palavras, os estudos de bioequivalência são estudos de biodisponibilidade comparativos entre o medicamento de referência e o medicamento teste (candidato a genérico) realizados em indivíduos saudáveis [5].

Os testes de dissolução *in vitro* são considerados a ferramenta mais sensível e fiável para uma possível previsão da *performance in vivo* do fármaco e são um possível indicador da disponibilidade fisiológica do mesmo. Desta forma, são realizados testes dissolução comparativos *in vitro* entre o medicamento teste (candidato a genérico) e o medicamento de referência antes de os submeter a um estudo de BD/BE de forma a maximizar a probabilidade de sucesso do posterior estudo de bioequivalência [6].

A presente dissertação insere-se num projeto da Sofarimex e tem como objetivos os seguintes pontos:

- Validação de uma metodologia analítica de dissolução para a determinação da substância ativa telmisartan, por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Aplicação da metodologia analítica validada no estudo dos perfis de dissolução de 3 lotes de cada dosagem do medicamento teste (telmisartan/hidroclorotiazida) – 80/25 mg TEL/HCTZ, 80/12,5 mg TEL/HCTZ e 40/12,5 mg TEL/HCTZ – e de um lote de cada

- dosagem do medicamento de referência (Micardis Plus®) em diferentes meios de dissolução de forma a avaliar a consistência e homogeneidade dos lotes produzidos;
- Avaliação da semelhança *in vitro* entre os lotes do medicamento teste e o medicamento de referência para cada dosagem nos diferentes meios de dissolução, através do cálculo do fator de similaridade, f_2 ;
 - Seleção de um lote do medicamento teste da maior dosagem – 80/25 mg TEL/HCTZ – a ser submetido ao estudo de bioequivalência *in vivo*.

De forma a atingir os objetivos, torna-se fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos, para demonstrarem através da validação, que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida que lhes é exigida.

O método usado e a validar é descrito numa monografia da farmacopeia dos Estados Unidos (USP): *Telmisartan and Hydrochlorothiazide Tablets* [7].

Segundo a norma “*Validation of analytical procedures: Definitions and Terminology*” os parâmetros a considerar são a curva de calibração (gama de trabalho e linearidade), a precisão (repetibilidade e precisão intermédia), a especificidade e a exatidão. Apesar de não enunciado na norma, foi também avaliada a estabilidade da substância ativa nas soluções de padrão e amostra em estudo.

2. GRUPO AZEVEDOS

O Grupo Azevedos, fundado em 1775 com o nome de botica Azevedo, foi responsável pela produção do primeiro medicamento em Portugal. Entre muitas outras fórmulas galénicas, o Grupo Azevedos produziu a primeira pomada de penicilina, introduziu o primeiro antibiótico contra a febre tifóide e a primeira vacina antipoliomielítica em Portugal. Atualmente, é um dos mais sólidos grupos farmacêuticos nacionais, sendo que um dos marcos mais importantes deste grupo farmacêutico foi a participação no prémio nobel da medicina atribuído ao Professor Egas Moniz.

O Grupo Azevedos está presente em mais de 40 mercados internacionais: Europa, Médio Oriente, África, Ásia e continente americano.

Um passo decisivo para a evolução do grupo Azevedos foi seu compromisso na investigação e desenvolvimento. Como resultado da investigação e pesquisa contínua de conhecimento para explorar novas oportunidades, esta área relevante de intervenção resulta em encontrar novas perspectivas, a única forma que permite uma melhoria constante em produtos e serviços com a marca Azevedos [8].

2.1 Sofarimex

Inaugurada em 1994, a Sofarimex é a empresa do Grupo Azevedos que se dedica ao fabrico de produtos farmacêuticos. Inicialmente era constituída com 60% do capital social pertencente aos Laboratórios Azevedos e 40% pertencente ao grupo francês Sanofi – Aventis. Atualmente, apresenta a forma jurídica de sociedade anónima constituída exclusivamente por capitais nacionais.

Dotada de um nível tecnológico avançado, a Sofarimex é especialista na produção farmacêutica de pequenas e médias séries à escala europeia e possui grande flexibilidade produtiva produzindo várias formas farmacêuticas nomeadamente, sólidos (pós, granulados, comprimidos, comprimidos revestidos, drageias e cápsulas), líquidos (xaropes, soluções, suspensões e solutos), pastosos (pomadas e cremes) e estéreis (líquidos de pequeno volume preparados assepticamente e liofilizados).

A fábrica, concebida na noção de uma previsível evolução do mercado farmacêutico de *outsourcing*, visa consolidar as posições já alcançadas e apostar na conquista de novos mercados, nomeadamente o mercado europeu.

Inicialmente concebida para uma capacidade total de 30 milhões de unidades de produto acabado a um turno, a Sofarimex pode responder a novas necessidades do mercado sem que se alterem os conceitos base da sua conceção, bastando para tal alargar o período de funcionamento da fábrica e/ou substituir os atuais equipamentos por outros de maior capacidade produtiva.

A flexibilidade de produção possibilita o fabrico de variadas dimensões de lotes em todas as formas, de mais de 650 produtos diferentes distribuídos segundo a Figura 2.1:



Figura 2.1 – Distribuição de produtos na Sofarimex

A conceção das instalações e infraestruturas e a organização do seu Sistema Integrado de Gestão permitem assegurar uma produção farmacêutica no integral cumprimento do Guia para o Bom Fabrico de Medicamentos (EUDRALEX Volume 4) e restante legislação aplicável.

A empresa é sujeita a inspeções periódicas por parte das entidades oficiais de saúde e da indústria, estando autorizada pela Direção Regional de Lisboa e Vale do Tejo, nos termos do Regulamento do Licenciamento da Atividade Industrial (RELAI).

A sua atividade está sujeita à supervisão da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED) que certifica o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico e autoriza o fabrico de medicamentos para uso humano e da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) que certifica o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico e autoriza o fabrico de medicamentos veterinários.

As demais autorizações são geridas de acordo com os procedimentos internos:

- SG01, Controlo dos documentos
- SG02, Controlo de requisitos legais e outros documentos de origem exterior (qualidade, ambiente e segurança)

sendo sujeitas a avaliação da conformidade legal periodicamente [9].

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Medicamentos Genéricos

No universo da saúde, a despesa com medicamentos é a que, ano após ano, tem mais crescido. Este crescimento põe em causa a sustentabilidade do sistema de saúde [10].

De forma a contrariar esta tendência, nos últimos dez anos o Estado português tomou diversas medidas no sentido de incentivar o uso de medicamentos genéricos (MG). As vantagens da utilização deste tipo de medicamentos surgem nos objetivos de contenção da despesa pública com os medicamentos, já que, para ser aprovado, o preço dos medicamentos genéricos tem de ser 20% ou 35% mais barato do que o medicamento de referência. Para os próprios doentes, a vantagem advém da possibilidade de usufruir de um medicamento de qualidade, com eficácia e segurança comprovada, a um preço inferior. Além disso, e porque os genéricos aumentam a concorrência, o preço de todos os medicamentos tem tendência a diminuir. A opção pelos medicamentos genéricos permite libertar recursos para o tratamento de mais doentes e de novas doenças [11, 12].

Face a este cenário, Portugal, tem apostado no desenvolvimento do mercado de genéricos, já que a introdução destes medicamentos a preços substancialmente mais baixos como substitutos de medicamentos de referência já existentes resultam em enormes vantagens económicas para os utentes e para os Serviços Nacionais de Saúde [13].

O medicamento de referência é, geralmente, o inovador cuja eficácia e segurança foram comprovadas por meio de ensaios químicos, biológicos, farmacêuticos, farmacológicos, toxicológicos e clínicos [14].

O termo “medicamento genérico” é definido, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), por um produto farmacêutico que é geralmente destinado a ser intercambiável com um produto inovador, e que é comercializado após a data de validade da patente original ou de outros direitos exclusivos terem expirado [15]. A atual definição para medicamentos genéricos, encontra-se na Diretiva 2001/83/EC, Artigo 10(2)(b), que afirma que um medicamento genérico é um produto que tem a mesma quantidade de substância(s) ativa(s) e a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o produto de referência tenha sido demonstrada por estudos adequados de biodisponibilidade. Os diferentes sais, ésteres, éteres, isómeros, misturas de isómeros, complexos ou derivados de uma substância ativa são considerados a mesma substância ativa, a menos que difiram significativamente no que diz respeito a segurança e/ou eficácia [16]. Neste contexto, torna-se importante referir que existem diferentes requisitos que os medicamentos genéricos devem cumprir. No entanto, uma das principais premissas que sustenta o uso seguro e eficaz dos medicamentos genéricos é o conceito de bioequivalência [15].

Os passos envolvidos no desenvolvimento de um medicamento genérico passam pela caracterização do medicamento de referência, desenvolvimento do medicamento genérico e finalmente a realização de um estudo de bioequivalência (BE) com o medicamento de referência [17].

3.1.1 Medicamentos Genéricos na Europa

Na Europa, o órgão responsável pela aprovação de produtos farmacêuticos é a Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Além da EMA, cada estado membro tem uma autoridade competente para essa mesma aprovação [15].

No caso de Portugal em concreto, a entidade reguladora que supervisiona o setor de medicamentos de uso humano é o INFARMED. Sempre que se pretenda introduzir um novo medicamento no mercado ou que sejam efetuadas alterações num medicamento, é obrigatório que o INFARMED seja informado para que possa conceder a Autorização de Introdução no Mercado (AIM) [18].

3.1.2 Biodisponibilidade

A ação terapêutica de um fármaco depende da existência de uma concentração efetiva do mesmo no seu local de ação, durante um período de tempo adequado. Assim, a disponibilidade do fármaco a partir da forma farmacêutica assume um papel crítico na eficácia clínica de um medicamento, sendo desta forma necessário caracterizar adequadamente o desempenho da formulação que o contém como medida adicional de segurança. Uma vez que a concentração de um fármaco no local de ação se encontra em equilíbrio com a concentração do mesmo na corrente sanguínea, para a maioria dos fármacos a determinação das suas concentrações ao longo do tempo no sangue ou urina tornam-se medidas indiretas, mas preditivas da sua concentração no seu local de ação.

A biodisponibilidade (BA) é um termo farmacocinético que descreve a velocidade e o grau com que uma substância ativa ou a sua forma molecular terapeuticamente ativa é absorvida a partir de um medicamento e se torna disponível no local de ação. A avaliação da biodisponibilidade é realizada com base em parâmetros farmacocinéticos que geralmente são calculados a partir dos perfis de concentração plasmática do fármaco ao longo do tempo.

Quando dois medicamentos apresentam a mesma biodisponibilidade no organismo, a sua eficácia clínica é considerada comparável [5].

3.1.3 Bioequivalência

Segundo a Agência Europeia do Medicamento, um estudo de bioequivalência tem por objetivo comparar as biodisponibilidades de dois medicamentos considerados equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas e que tenham sido administrados na mesma dose molar. Entende-se como equivalência farmacêutica quando duas formulações contêm a mesma quantidade de substância ativa e se apresentam na mesma forma farmacêutica. Já dois produtos são alternativos farmacêuticos, se apresentarem diferentes sais, ésteres, éteres, isómeros, misturas de isómeros, complexos ou derivados da substância ou se diferirem na forma farmacêutica ou dosagem.

Se nestas condições as biodisponibilidades de dois medicamentos forem consideradas similares, os seus efeitos, no que respeita à eficácia e segurança dos mesmos serão essencialmente os mesmos [19].

3.2 Genéricos no Tratamento de Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte entre adultos (29,2% do total das mortes globais) no mundo industrializado e nos países em desenvolvimento e provavelmente este cenário manter-se-á num futuro próximo. A hipertensão arterial é um fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, se a tensão arterial for controlada, podem ser impedidas lesões de órgãos alvo e, a longo prazo, a probabilidade destas complicações pode ser reduzida. Sabe-se que apenas uma pequena percentagem dos pacientes com hipertensão (geralmente menos de 30%) têm a tensão arterial controlada.

O tratamento da hipertensão arterial com a combinação de duas substâncias ativas é vantajoso e pode aumentar o sucesso da eficácia do medicamento. Assim, a combinação de dois fármacos que possam interferir de forma benéfica é suscetível de aumentar o controlo da tensão arterial. Estudos têm mostrado que a tensão arterial pode ser controlada em quase dois terços dos casos pela prescrição cuidadosa de dois medicamentos. Neste contexto, a combinação de um bloqueador do sistema renina-angiotensina (RAS) com um diurético é uma combinação lógica. O efeito natriurético do diurético, que leva a uma diminuição do volume plasmático, estimula a secreção da renina que, conseqüentemente, aumenta a produção de angiotensina II e de aldosterona que por sua vez provoca vasoconstrição promovendo a retenção de água e de sódio. A consequência direta destas respostas fisiológicas é uma limitação do efeito anti-hipertensivo do diurético. O bloqueio do RAS nestas condições potencia o efeito do diurético.

Desta forma, entende-se o desenvolvimento de um grande número de medicamentos que contenham um bloqueador RAS e um diurético, como é o caso do telmisartan e hidroclorotiazida [20].

3.2.1 Telmisartan/Hidroclorotiazida

O antagonista do recetor da angiotensina II do tipo-1 (AT_1), telmisartan (TEL), e o diurético tiazídico hidroclorotiazida (HCTZ) são dois agentes anti-hipertensivos que têm uma eficácia clínica reconhecida no tratamento da hipertensão. No entanto, sabe-se que quando tomados individualmente, estes fármacos podem revelar um controlo insuficiente no tratamento desta doença. Assim, foram desenvolvidos por diferentes fabricantes uma combinação de doses fixas de telmisartan/hidroclorotiazida no sentido de melhorar o tratamento da hipertensão. Existem no mercado 3 combinações diferentes destes dois fármacos: 80/25 mg, 80/12,5 mg e 40/12,5 mg telmisartan/hidroclorotiazida [20].

No presente estudo o medicamento de referência com o qual foi comparado o medicamento teste em estudo (telmisartan/hidroclorotiazida), foi o Micardis Plus® da Boehringer Ingelheim.

O Micardis Plus® é um medicamento que contém duas substâncias ativas, telmisartan e hidroclorotiazida e está disponível na forma de comprimidos bicamada, como ilustrado na Figura 3.1, nas seguintes dosagens: 40 mg ou 80 mg de telmisartan e 12,5 mg de hidroclorotiazida e 80 mg de telmisartan e 25 mg de hidroclorotiazida).

Este medicamento é utilizado em doentes com hipertensão essencial (pressão arterial elevada) não adequadamente controlada com telmisartan em monoterapia (isoladamente). “Essencial” significa que não foi encontrada uma causa específica para a hipertensão. Este medicamento só pode ser obtido mediante receita médica. A associação das duas substâncias ativas tem um efeito aditivo, permitindo uma redução da pressão arterial superior à que se conseguiria com cada um dos medicamentos tomados isoladamente. Ao baixar a tensão arterial, diminuem os riscos associados à tensão arterial elevada, nomeadamente o de acidente vascular cerebral [21]. Apesar do medicamento teste em estudo e do medicamento de referência conterem as duas substâncias ativas acima mencionadas, na presente dissertação apenas foi estudada uma, o telmisartan, devido à impossibilidade de quantificar as duas substâncias com o mesmo método simultaneamente.

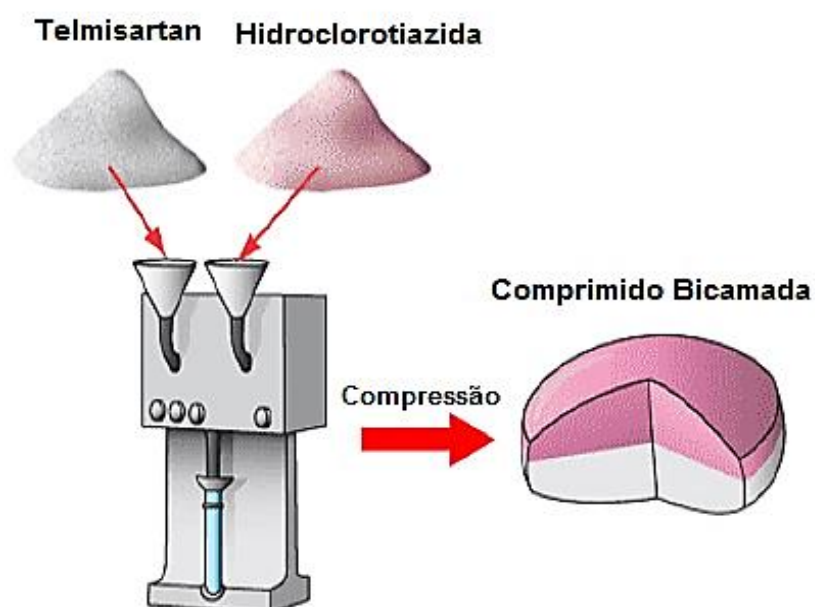


Figura 3.1 - Conceito de comprimidos bicamada, Adaptado [22]

3.2.2 Telmisartan

O telmisartan é um potente e seletivo inibidor antagonista dos recetores da angiotensina II utilizado no tratamento da hipertensão arterial. Este fármaco fornece benefícios de proteção contra o dano vascular e renal causados por insuficiência cardíaca e diabetes. O tratamento com TEL apresenta várias vantagens em relação a outros fármacos, destacando-se sua seletividade pelos recetores AT₁, efeitos hipotensores de longa duração (exigindo apenas uma administração por dia), boa tolerabilidade e perfil de segurança favorável [23].

O telmisartan foi aprovado em Portugal no ano de 1998 e a sua monografia está disponível na Farmacopeia dos Estados Unidos desde 2011. É ainda importante referir que este fármaco pode ser administrado em monoterapia ou em terapia combinada e é comercializado na forma de comprimidos de administração oral [23, 24].

Características físico-químicas Telmisartan

A estrutura química do telmisartan, representada na Figura 3.2, consiste em dois anéis imidazol e um ácido carboxílico aromático [25].

Quimicamente conhecido como 4'-[4-Metil-6-(1-metil-2-benzimidazolil)-2-propil-1-benzimidazolil] metil}-2-ácido bifenilcarboxílico, este composto apresenta-se na forma de um pó cristalino branco com um peso molecular de 514,6 g/mol e o seu ponto de fusão varia entre 261 e 263 °C. A solubilidade deste fármaco em soluções aquosas é dependente do pH, apresentando valores máximos em pH's baixos e em pH's altos e sendo praticamente insolúvel entre os valores de pH 3-9. Dentro da classe dos fármacos antagonistas dos recetores da angiotensina II (valsartan, losartan, irbesartan, candesartan), o TEL é o composto mais lipofílico com um valor de log P de 3,2 (*n*-octanol/tampão 7,4), apresentando uma alta permeabilidade intestinal. Este fármaco é um ácido fraco e apresenta três valores de pK_a: 3,5; 4,1 e 6,0 [26].

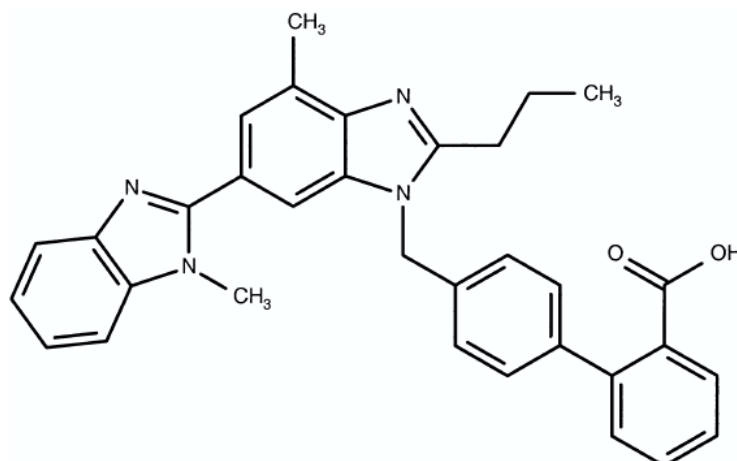


Figura 3.2 – Estrutura química telmisartan

Propriedades Farmacocinéticas

Estudos mostram que, após a administração oral, o TEL é rapidamente absorvido a partir do trato-gastrointestinal (TGI), apresentando uma biodisponibilidade de aproximadamente 50%. Este fármaco apresenta um tempo de meia-vida de 24h, atingindo o pico de concentração plasmática máxima dentro de aproximadamente 0,5 a 1h após a administração de uma dose oral [27].

A distribuição do TEL é determinada pelas suas propriedades físico-químicas. Uma vez que este fármaco é altamente lipofílico irá ter uma elevada permeabilidade intestinal e consequentemente atravessará facilmente as membranas biológicas [26].

Mecanismo de Ação

Este fármaco é um potente e seletivo inibidor antagonista dos recetores da angiotensina II (tipo AT₁), o que significa que bloqueia a ação de uma hormona no organismo designada angiotensina II. A angiotensina II é um agente vasoconstritor potente (uma substância que estreita os vasos sanguíneos aumentando a resistência do fluxo sanguíneo e consequentemente a pressão arterial). O telmisartan desloca a angiotensina II do seu local de ligação ao recetor do subtipo AT₁. Ao bloquear o recetor do subtipo AT₁, o telmisartan inibe o efeito da hormona, permitindo que os vasos sanguíneos se alarguem e desta forma promove a diminuição da pressão arterial [21].

3.3 Dissolução de Fármacos

3.3.1 Evolução Histórica

A administração oral de formas farmacêuticas sólidas tem sido, no último século, a maior via de administração de fármacos. No entanto, só há 50 anos é que os cientistas perceberam a importância dos processos de dissolução na disponibilidade fisiológica dos fármacos [28].

O processo de dissolução consiste na interação do soluto com as moléculas do solvente e na difusão das moléculas mais externas do soluto no meio envolvente, através da denominada camada de difusão [29].

A primeira referência à dissolução de fármacos surgiu em 1897 quando Noyes e Whitney realizaram as primeiras experiências de dissolução e publicaram o artigo *“The Rate of Solution of Solid Substances in Their Own Solution”*. Juntos, Arthur A. Noyes e Willis R. Whitney, estudaram a dissolução de dois compostos pouco solúveis: ácido benzoico e cloreto de chumbo. Segundo o que os autores verificaram, a velocidade de dissolução ($\frac{dC}{dt}$) seria proporcional à diferença entre a concentração de saturação do fármaco no meio, C_s, e a concentração do fármaco num momento t, C_t. Esta relação pode ser expressa pela expressão matemática desenvolvida por ambos, Equação 3.1:

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C_t)$$

Equação 3.1 - Equação Noyes–Whitney

Onde *k* é uma constante. No decorrer da experiência, os autores garantiram a constante exposição da superfície externa das substâncias em estudo com o meio de dissolução e ainda

um excesso de quantidade de substância necessária de forma a atingir a concentração de saturação do próprio meio. Os autores atribuíram o fenómeno de dissolução das moléculas a uma fina camada que se forma à volta das partículas, através da qual estas se difundem para o meio envolvente. Este modelo, é denominado de “Modelo da Camada de Difusão” [28].

Nos anos de 1900 a 1903, Brunner e Tolloczko, demonstraram que a velocidade de dissolução também depende da superfície da partícula exposta, da temperatura, da configuração do equipamento do ensaio e da estrutura de superfície da partícula. Assim, surgiu a Equação 3.2 para descrever a dissolução das substâncias, a qual derivou da Equação 3.1 ($k = k_1 * S$):

$$\frac{dC}{dt} = k_1 * S(C_s - C_t)$$

Equação 3.2

Onde S é a área de superfície e k_1 uma constante [28].

Mais tarde, em 1904, Nerst e Brunner alteraram a Equação 3.2, com base no conceito da camada de difusão da segunda lei de Fick, estabelecendo uma nova relação entre a constante da Equação 3.2 e o coeficiente de difusão ($k_1 = D/(Vh)$), permitindo a estimativa da espessura da camada de difusão, Equação 3.3. Esta equação é a mais aceite na comunidade científica.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh}(C_s - C_t)$$

Equação 3.3

Onde: D é o coeficiente de difusão, S é a área de superfície, h a espessura da camada de difusão e V o volume do meio de dissolução. [28].

Em 1931, Hixson e Crowell desenvolveram um modelo matemático para descrever o processo de dissolução, a chamada “lei da raiz cúbica”, que relaciona a massa inicial de substância e a que fica por dissolver-se, em função do tempo, Equação 3.4.

$$\sqrt[3]{w_0} - \sqrt[3]{w} = k_2 * t$$

Equação 3.4

Onde w_0 é a massa inicial de substância, w é a quantidade de substância que fica por dissolver e k_2 uma constante [30].

Na década de 1950, a dissolução continuou a ser estudada e começou a ser reconhecida como um fator importante na previsão da bioequivalência de fármacos. No entanto, só na década de 1960 é que a taxa dissolução e a taxa de absorção foram correlacionadas. Uma infinidade de trabalhos de pesquisa resultou no primeiro relato do efeito do fenómeno dissolução na

biodisponibilidade do fármaco [31]. Durante esta década, a relação entre a dissolução e a eficácia clínica foi demonstrada para alguns medicamentos. Assim, em 1970, com a crescente evidência da associação entre a dissolução e o desempenho do medicamento, foi publicado o primeiro teste de dissolução oficial pela USP [32].

Hoje em dia, os testes de dissolução *in vitro* são utilizados para servir diversos propósitos, como será abordado no ponto 3.3.2 [31].

3.3.2 Aplicação dos Ensaio de Dissolução

A dissolução pode ser definida de forma simplificada como o processo pelo qual o fármaco é libertado da sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo.

As formas farmacêuticas sólidas de uso oral, como é o caso dos comprimidos, são uma das formas mais eficazes no tratamento de doenças [33]. Antes de exercerem o seu efeito terapêutico, este tipo de fármacos deve ser absorvido. A absorção sistêmica de um fármaco de uso oral contido numa forma farmacêutica sólida é composta por três fases distintas, como ilustrado na Figura 3.3: desagregação do medicamento seguida da libertação do fármaco, dissolução/solubilização do fármaco nos fluídos do local de absorção e transferência do fármaco através das membranas que delimitam o trato gastrointestinal para a circulação sistêmica. Qualquer fator que afete um destes três passos pode alterar a biodisponibilidade do fármaco e, conseqüentemente, alterar o seu efeito terapêutico [1]. O passo mais lento nesta série de etapas é chamado de “*rate-limiting step*”. O “*rate-limiting step*” para fármacos com uma baixa solubilidade aquosa (pertencentes à classe II do sistema de classificação biofarmacêutica), como é o caso da molécula em estudo (como veremos no ponto 3.6), é a dissolução e, conseqüentemente, este fenómeno irá exercer um forte efeito na biodisponibilidade do fármaco [34].

Os testes de dissolução *in vitro* são considerados a ferramenta mais sensível e fiável para uma possível previsão da *performance in vivo* do fármaco e são um possível indicador da disponibilidade fisiológica do mesmo [6].

Estes testes estão descritos nas farmacopeias com o objetivo de avaliar a libertação de fármacos e começaram por ser desenvolvidos apenas para fármacos contidos em formas farmacêuticas sólidas de uso oral de libertação imediata, nomeadamente comprimidos e cápsulas. No entanto, mais recentemente, também é possível recorrer a testes para avaliar a libertação de fármacos contidos noutras formas farmacêuticas sólidas, semissólidas, suspensões, aerossóis e em formas de libertação modificada [35, 36].

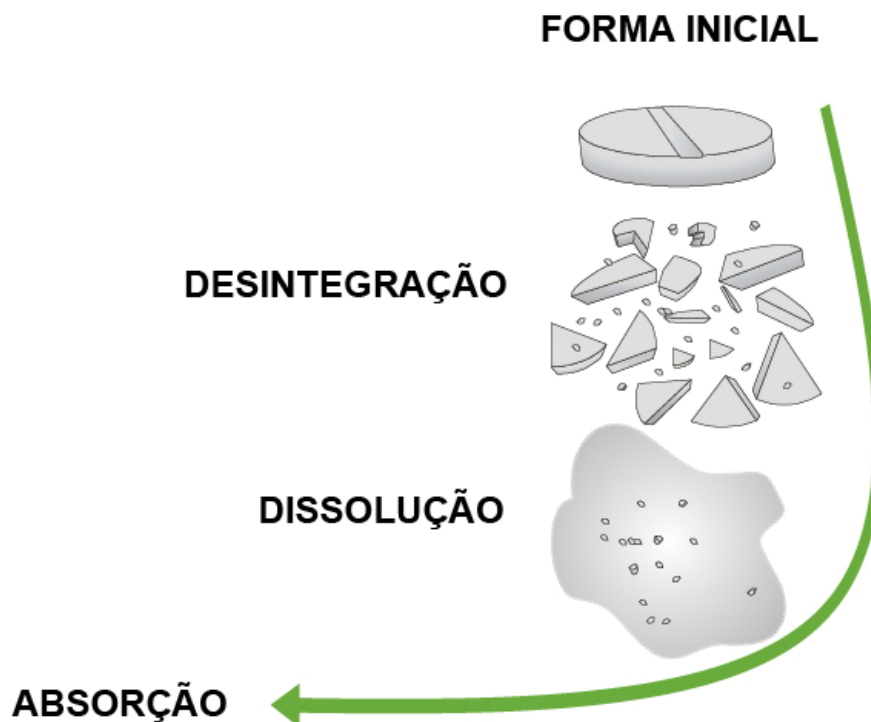


Figura 3.3 - Esquema do processo de absorção, Adaptado [37]

Os estudos de dissolução são utilizados em diferentes áreas da indústria farmacêutica [35]:

1. Controlo de Qualidade (CQ):

Os ensaios de dissolução são usados como teste de rotina de controlo de qualidade para detetar desvios de produção, avaliar a estabilidade da formulação em função do tempo e das condições de armazenagem, assegurar a consistência e reprodutibilidade dentro de um mesmo lote e lote a lote e avaliar modificações efetuadas no processo [16, 38].

2. Investigação e Desenvolvimento (I&D):

Na área de investigação e desenvolvimento, os ensaios de dissolução são utilizados para direcionar o desenvolvimento e avaliação de novas formulações, para permitir, em alguns casos, a isenção de estudos de bioequivalência para dosagens menores de um mesmo produto e para produtos pertencentes à classe I do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), para permitir estabelecer semelhanças entre medicamentos teste (candidatos a genéricos) e medicamentos de referência, para permitir, em alguns casos, o estabelecimento de uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) e ainda para demonstrar a consistência entre lotes de forma a escolher um lote adequado do produto teste para o estudo *in vivo* [16, 38].

O foco principal dos ensaios de dissolução utilizados nesta área (I&D) é a previsão de como irá ocorrer a libertação do fármaco *in vivo* [35]. Desta forma, devem ser utilizadas condições que simulem adequadamente o ambiente fisiológico do trato gastrointestinal uma vez que estes ensaios tentam relacionar a libertação do fármaco *in vitro* com a libertação do fármaco *in vivo* sendo esta relação formalmente referida como uma correlação *in vitro-in vivo* [39, 40].

Neste contexto, os ensaios de dissolução *in vitro* têm emergido como uma ferramenta essencial no desenvolvimento e aprovação de medicamentos genéricos [41].

Sendo um dos objetivos do presente estudo a seleção de um lote do medicamento teste para um estudo *in vivo* e visto que, como já abordado anteriormente, os testes de dissolução *in vitro* são considerados a ferramenta mais sensível e fiável para uma possível previsão do desempenho *in vivo* do fármaco e são um possível indicador da disponibilidade fisiológica do mesmo, foi realizada uma extensa comparação entre os perfis de dissolução (ensaios de dissolução de múltiplos pontos) da formulação teste e a formulação de referência, de acordo com os critérios da “*Guideline On The Investigation Of Bioequivalence, 2010*”.

Segundo esta *guideline*, devem ser avaliados perfis de dissolução de 3 lotes do produto teste de forma a garantir a consistência e homogeneidade dos lotes produzidos e cada lote deve ser avaliado em pelo menos três pH's diferentes (regra geral pH 1,2, 4,5 e 6,8) e ainda no meio escolhido para a análise do produto pelo controlo de qualidade (no caso do telmisartan, pH 7,5). Além disso, como já foi referido anteriormente, através dos ensaios de dissolução, é possível evitar que tenham de ser realizados estudos de BD/BE em todas as dosagens do mesmo medicamento. No entanto, para que esta isenção seja possível, segundo a mesma *guideline*, alguns aspetos devem ser considerados:

- Deve ser demonstrada, por meio de estudos de biodisponibilidade, a bioequivalência para a maior dosagem do medicamento teste;
- As dosagens para as quais se pretende a isenção de estudos de BD/BE têm que ser produzidas pelo mesmo processo de fabrico da dosagem para a qual tenha sido demonstrada bioequivalência;
- A composição qualitativa dessas dosagens e da dosagem para a qual foi provada a bioequivalência deve ser a mesma;
- A composição das dosagens para as quais se pretende a isenção de estudos de BD/BE deve ser quantitativamente proporcional à da dosagem para a qual foi demonstrada bioequivalência;
- Os testes de dissolução *in vitro* das dosagens que se pretende isentar de estudos *in vivo* devem ser aceitáveis (devem apresentar perfis de dissolução semelhantes em todos os meios à dosagem para a qual foi demonstrada bioequivalência).

Em relação à proporcionalidade de comprimidos bicamada, como é o caso do presente estudo, esta deve ser avaliada para cada camada independentemente [16].

Na presente dissertação são consideradas três dosagens: 80/25 mg TEL/HCTZ, 80/12,5 mg TEL/HCTZ e 40/12,5 mg TEL/HCTZ). Assim, é possível concluir que a maior dosagem (80/25 mg) é totalmente proporcional à menor dosagem (40/12,5 mg). Além disso, no caso do telmisartan, a dosagem 80/12,5 mg é igual à dosagem 80/25 mg e no caso da hidroclorotiazida a dosagem 80/12,5 mg é igual à dosagem 40/12,5 mg. Desta forma, pode vir a ser possível isentar as dosagens mais baixas do medicamento em estudo de um estudo de bioequivalência depois de ser provada a bioequivalência para a maior dosagem.

3.3.3 Desenvolvimento de um Teste de Dissolução

O procedimento de dissolução envolve diferentes componentes, nomeadamente: o meio de dissolução, o aparelho de dissolução, o tipo de ensaio de dissolução (de múltiplos pontos, um único ponto ou de dois pontos) e ainda o método analítico pelo qual as amostras resultantes do ensaio de dissolução são analisadas. Todos estes componentes devem ser adequadamente escolhidos para que o método de dissolução seja reproduzível no dia a dia do laboratório e suficientemente robusto para que outros laboratórios o possam utilizar.

O primeiro passo no desenvolvimento de um teste de dissolução passa pela escolha do meio apropriado, sendo que essa escolha deve ter em conta as propriedades físicas e químicas da substância ativa do produto em causa, como é o caso da solubilidade e estabilidade da substância em solução em função do pH. O volume do meio de dissolução varia, em média, entre 500-1000 mL dependendo da solubilidade da substância e da dosagem em teste, devendo ser escolhido um volume que garanta a completa solubilidade da quantidade em estudo, sendo 900 mL o volume mais vulgarmente utilizado. A escolha do aparelho de dissolução é baseada no tipo de forma farmacêutica e a velocidade de agitação vai variar consoante o aparelho escolhido e deve ser ajustada para que o ensaio consiga ser discriminatório. O tipo de ensaio de dissolução vai ser selecionado de acordo com o propósito pelo qual se está a realizar o teste de dissolução. Para formas farmacêuticas de libertação imediata ou rápida, o tempo de ensaio varia, em média, entre 30 a 60 minutos, podendo a duração do ensaio ser estendida até às 24h no caso de alguns produtos de libertação modificada. Para análises de libertação de produto acabado, muitas vezes é suficiente a recolha de uma única amostra no fim do ensaio. No entanto, no caso de um desenvolvimento de uma formulação onde seja necessário fazer comparações com outra formulação, como é o caso do presente estudo, devem ser realizados perfis de dissolução (ensaio de dissolução de múltiplos pontos) sendo recolhidas várias amostras ao longo do tempo de forma a permitir caracterizar adequadamente a velocidade a que a substância ativa é libertada para o meio a partir da forma farmacêutica. Outro aspeto importante a considerar é a recolha das amostras, que pode ser manual ou automática. Além disso, as amostras devem ser tratadas (por filtração, centrifugação ou decantação) de forma a que partículas não dissolvidas, da substância ativa ou de excipientes insolúveis que poderiam causar turbidez na solução, não se misturem nas amostras e distorçam os resultados.

Finalmente, deve ser escolhido o método analítico para analisar as amostras do teste de dissolução. O método escolhido deve ser suficientemente sensível para determinar com exatidão a quantidade de substância ativa presente nas diferentes amostras [42].

No presente estudo, as condições de ensaio utilizadas nos diferentes ensaios de dissolução foram baseadas na monografia descrita na Farmacopeia dos Estados Unidos, para comprimidos constituídos por telmisartan e hidroclorotiazida [7]. Desta forma, não foi necessário a realização de testes preliminares de forma a escolher quais as condições ideais de ensaio.

3.3.4 Comparação Perfis de Dissolução

Os perfis de dissolução são obtidos a partir da percentagem dissolvida do fármaco em diferentes tempos de amostragem.

Como referido no ponto 3.3.2, foi feita uma extensa comparação entre os perfis de dissolução do medicamento teste e do medicamento de referência no presente estudo.

Para que seja possível realizar esta comparação, é necessário a utilização de um método matemático.

Vários métodos têm sido propostos para a comparação de perfis de dissolução, sendo estes agrupados em diferentes categorias [43]:

- Métodos Baseados na Análise de Variância;
- Métodos de Modelos Independentes;
- Métodos de Modelos Dependentes.

Apesar dos vários métodos propostos, segundo a “*Guideline On The Investigation Of Bioequivalence, 2010*”, é recomendado o método do modelo independente para a comparação de perfis de dissolução entre um medicamento teste e um medicamento de referência [16]. Este método foi proposto por Moore e Flanner em 1996. Os autores desenvolveram duas equações que se basearam num fator de diferença (f_1) e num fator de semelhança (f_2), Equação 3.5 e Equação 3.6:

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} * 100$$

Equação 3.5

$$f_2 = 50 * \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right]$$

Equação 3.6

onde n é número de tempos do ensaio; R_t e T_t são os valores de dissolução do produto de referência e do produto teste no tempo t.

O fator de diferença é uma medida de erro relativo entre duas curvas, isto é, através da determinação do fator de diferença obtém-se, em percentagem, a diferença entre duas curvas.

Quanto ao fator de similaridade, este é a transformação logarítmica da soma do quadrado do erro. Através deste fator é possível obter a percentagem de similaridade da dissolução entre duas curvas [44].

É importante referir que todos os resultados relativos aos perfis de dissolução do presente estudo foram avaliados segundo os critérios da *guideline* de bioequivalência da EMA que só tem em consideração o fator de semelhança, f_2

Segundo esta *guideline*, a avaliação do fator de similaridade é baseada nas seguintes condições:

- Os tempos de ensaio devem ser os mesmos para ambas as formulações e devem considerar-se, no mínimo, 3 tempos (excluindo zero);
- Utilização de doze unidades para cada tempo de ensaio e para cada formulação;
- O coeficiente de variação no primeiro tempo de ensaio não deve ser superior a 20% e a 10% nos restantes tempos de ensaio;
- Não considerar mais do que um valor médio acima de 85% para cada formulação.

Segunda a mesma *guideline*, duas curvas de dissolução são consideradas similares quando os valores de f_2 estão entre 50 e 100.

É ainda importante frisar que caso a percentagem dissolvida para ambas as formulações seja superior a 85% em apenas 15 minutos, os medicamentos são considerados semelhantes sem que seja preciso recorrer a cálculos matemáticos [16].

Relativamente aos valores de f_1 , apesar destes não serem considerados no presente estudo, segundo a “*Guidance for Industry – Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*” devem estar entre 0 e 15 [45].

3.3.5 Aparelho de Dissolução

A seleção do aparelho a ser utilizado num ensaio de dissolução é determinada pelas características da forma farmacêutica do fármaco [46]. A Farmacopeia Europeia propõe para a realização dos ensaios de dissolução de formas farmacêuticas sólidas quatro aparelhos: em cestos (aparelho 1), com pás (aparelho 2), no aparelho de pistões (aparelho 3) ou ainda no aparelho de fluxo contínuo (aparelho 4) [47]. No entanto, os aparelhos de dissolução mais usados são os aparelhos 1 e 2, sendo ambos muito utilizados para avaliar a dissolução cápsulas e comprimidos [46]. No presente estudo o aparelho utilizado no decorrer dos ensaios foi o aparelho 2, aparelho com pá giratória.

3.3.5.1 Aparelho com Pá Giratória

Este aparelho (Figura 3.4) é constituído por recipientes cilíndricos de fundo hemisférico de vidro ou outro material transparente e inerte, estando estes imersos num banho de água. Os recipientes devem ter uma tampa de forma a evitar a evaporação do meio de dissolução. Estas tampas têm orifícios que permitem a passagem da haste do agitador, a introdução de um termómetro e a introdução dispositivos para a colheita de amostras.

O aparelho apresenta um agitador que consiste numa haste vertical que na extremidade inferior tem fixada uma pá. Esta haste é inserida no recipiente de dissolução de forma a que o seu eixo não desvie em nenhuma altura do ensaio mais de 2 mm do eixo vertical do recipiente. A parte inferior da pá deve manter uma distância de 25 ± 2 mm do fundo do recipiente. Relativamente à parte superior da haste do agitador liga-se a um motor que possui um regulador de velocidade sendo que a rotação do agitador deve ser uniforme sem oscilações apreciáveis que possam influenciar os resultados.

O ensaio de dissolução inicia-se com a colocação do meio nos copos com agitação das pás para que seja removido o ar do meio e até a temperatura do meio atingir os $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A amostra deve ser introduzida de forma a ficar depositada no fundo do recipiente de dissolução e antes do dispositivo de agitação ser colocado em movimento.

A amostragem deve ocorrer no momento indicado ou com intervalos de tempos previamente estabelecidos. Quando a amostra é retirada em mais de uma toma, o volume retirado deve ser compensado com igual volume de meio de dissolução. Caso não ocorra reposição do volume de amostra retirado, a variação de volume deve ser tida em consideração nos cálculos da dissolução.

Quando necessário, as amostras devem ser filtradas, através de um filtro inerte que não absorva a substância ativa nem contenha substâncias extraíveis que interfiram posteriormente no doseamento [47].

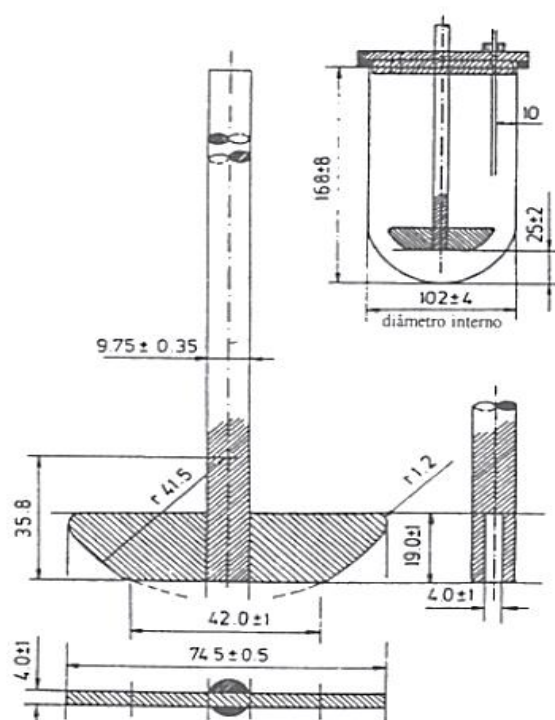


Figura 3.4 - Aparelho de Dissolução com Pá Giratória (dimensões em milímetros), [48]

3.4 Fatores que Influenciam a Dissolução

São diversas as variáveis que podem alterar a taxa de dissolução *in vitro*. O conhecimento destas variáveis assume um papel fundamental durante o desenvolvimento do produto. Estas variáveis podem ser agrupadas em: fatores relacionados com o fármaco (propriedades físico-químicas do fármaco) e com a sua formulação, fatores relacionados com o ensaio de dissolução e, por fim, fatores associados à forma farmacêutica [33].

3.4.1 Fatores relacionados com o fármaco e com a formulação

3.4.1.1 Solubilidade

A solubilidade pode ser definida como a quantidade de uma substância que se dissolve num determinado volume de solvente quando submetido a uma determinada temperatura [49].

Esta propriedade é um parâmetro chave nos estudos de pré-formulação e, normalmente, é determinada através da adição de um excesso de fármaco ao meio, seguida de uma agitação da suspensão durante um determinado período, sendo após a agitação efetuada uma filtração ou centrifugação da suspensão e, finalmente, a medição da quantidade de fármaco dissolvida.

As substâncias podem ser classificadas quanto à sua solubilidade, de acordo com a Tabela 3.1 [48].

Tabela 3.1 - Solubilidade das substâncias, [48]

Termos	Quantidades aproximadas do solvente, em mililitros, para um grama de substância
Muito solúvel	Menos de 1
Facilmente solúvel	De 1 a 10
Solúvel	De 10 a 30
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100
Muito pouco solúvel	De 1.000 a 10.000
Praticamente insolúvel	Mais de 10.000

A baixa solubilidade pode ser causada por dois fatores: a elevada lipofília ou as fortes interações intramoleculares, que proporcionam a necessidade de uma maior quantidade de energia para ocorrer a solubilização [50]. A solubilidade de ácidos e bases fracas é dependente da sua constante de ionização, K_a e do pH do meio de dissolução [51].

O pK_a pode ser definido como o pH em que 50% das moléculas do fármaco estão na forma ionizada e 50% na forma não ionizada sendo que o seu valor depende da estrutura molecular da molécula.

Para verificar o efeito do pH na ionização do fármaco é possível usar a equação de Henderson-Hasselback, podendo esta ser adaptada caso se esteja a analisar um ácido ou uma base [52].

Para um ácido (XH), a relação entre as formas ionizadas e não ionizadas é dada pela Equação 3.7:

$$pH = pKa + \log \frac{[X^-]}{[XH]}$$

Equação 3.7 - Efeito do pH na ionização de ácidos

Em que X^- é a forma ionizada do ácido.

Para uma base (X), a relação entre as formas ionizadas e não ionizadas é dada pela Equação 3.8:

$$pH = pKa + \log \frac{[X]}{[XH^+]}$$

Equação 3.8 - Efeito do pH na ionização de bases

Em que XH^+ é a forma ionizada da base.

O grau de ionização de uma molécula pode ser conhecido se se souber o(s) seu(s) valor(es) de pK_a e o pH do meio de dissolução [52].

3.4.1.2 Tamanho da Partícula

É possível perceber pela Equação 3.3, que o aumento da área de superfície de uma partícula (S), pode levar ao aumento da taxa de dissolução [53].

A velocidade de dissolução é diretamente proporcional à área de superfície do fármaco. Desta forma, são conseguidas maiores taxas de dissolução com a redução do tamanho das partículas [33].

3.4.1.3 Polimorfismo

Muitos fármacos são capazes de adotar uma ou mais estruturas cristalinas puras de forma identificável e definida ou amorfa e sem estrutura definida dependendo das condições (temperatura, solvente, tempo) sob as quais a cristalização é induzida. Esta propriedade é denominada de polimorfismo [54].

O polimorfismo, leva a que as diferentes estruturas de um mesmo fármaco difiram nas propriedades físico-químicas (ponto de fusão, densidade, estabilidade, solubilidade e velocidade de dissolução) [51].

3.4.1.4 Excipientes

Os excipientes são todos os componentes adicionados a um medicamento com a exceção da/das substância/s ativa/s (API) [55].

Os excipientes utilizados na formulação de um medicamento permitem uma administração adequada da substância ativa, facilitam o fabrico do produto, aumentam a estabilidade e ainda

melhoram o aspeto externo, sabor e odor do medicamento. Apesar dos excipientes serem tradicionalmente considerados como substâncias inativas, diversos estudos demonstram que alguns excipientes têm a capacidade de interagir com a substância ativa da formulação e, consequentemente, promover ou não uma melhor dissolução do medicamento nos fluidos humanos.

Os excipientes podem ser agrupados de acordo com a categoria a que pertencem:

- Diluentes: substâncias que são adicionadas às formulações para darem volume ao comprimido com intuito de originar comprimidos com o peso conveniente.
- Ligantes: têm como função ajudar na compressão e assegurar que a formulação permaneça intacta durante o seu período de vida útil e que, no entanto, continue a desintegrar-se *in vivo*.
- Desagregantes: são adicionados à formulação de forma a facilitar a desagregação do comprimido de modo a aumentar a superfície de contacto das partículas com o meio para facilitar a solubilização da substância ativa.
- Lubrificantes: Excipientes que têm como função melhorar o escoamento e diminuir o atrito dos pós na máquina de compressão e/ou impedir a aderência dos pós à mesma. Normalmente, são usados em pequenas quantidades na formulação uma vez que podem retardar a dissolução do fármaco ao formarem uma película entre os pós e o meio de dissolução.

Uma categoria de excipientes não enunciada acima e que pode ser utilizada na formulação de fármacos hidrofóbicos de forma a melhorar a sua taxa de dissolução são os tensioativos. Estes, quando adicionados, permitem a redução da tensão superficial entre o meio de dissolução e as partículas do fármaco facilitando a molhabilidade do fármaco, o que, consequentemente, aumenta a sua dissolução [56].

Os tensioativos são moléculas que apresentam uma parte polar (hidrofílica) e uma parte apolar (hidrofóbica). Este tipo de molécula pode ser representado segundo a Figura 3.5.

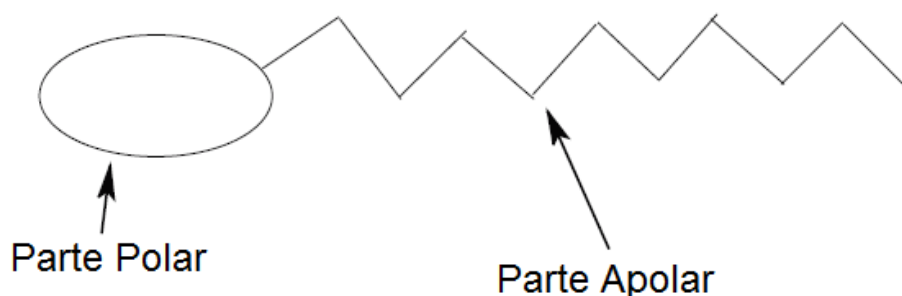


Figura 3.5 - Representação esquemática de um tensioativo, [57]

Consoante a natureza do grupo polar, podem ser classificados em quatro grupos: aniônicos, catiónicos, anfotéricos e não iónicos. Os tensioativos aniônicos apresentam cargas negativas na sua parte polar, enquanto que os catiónicos apresentam cargas positivas. Já os tensioativos anfotéricos podem apresentar cargas positivas ou negativas dependendo das condições do meio onde são colocados. Finalmente, os tensioativos não iónicos não apresentam qualquer tipo de carga na sua parte polar.

Na formulação teste em estudo é usado um tensioativo aniónico, lauril sulfato de sódio (SLS), representado na Figura 3.6 [57].

Apesar de serem utilizados para melhorar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos, pode haver casos em que há a interação entre o tensioativo e espécies com cargas opostas, levando à formação de um sal insolúvel [58]. A título de exemplo, refira-se um estudo realizado por Jain et al. Neste estudo, os autores testaram uma formulação de PG-300995 com SLS e verificaram que em pH 1,0 o fármaco seria completamente catiónico levando à formação de um sal insolúvel com o SLS aniónico [59].

Outra estratégia para melhorar a taxa de dissolução de fármacos que apresentem uma solubilidade dependente do pH é a adição de excipientes básicos ou ácidos à formulação [60]. Relativamente ao telmisartan, a maioria das formulações existentes no mercado contém excipientes básicos, denominados de agentes alcalinos [61]. Na presente formulação do medicamento teste e do medicamento de referência são utilizados como agentes alcalinos o hidróxido de sódio e a meglumina.

Na Tabela 3.2 são apresentados os excipientes da formulação teste em estudo e da formulação do medicamento de referência.

Tabela 3.2 – Excipientes Utilizados na formulação teste e referência

Excipientes Utilizados		
Categoria, [62]	Formulação Teste	Formulação de Referência, [63]
Agentes Alcalinos	Hidróxido de Sódio e Meglumina	Hidróxido de Sódio e Meglumina
Ligante	PVP K 25	PVP K 25
Diluyente	Manitol	Sorbitol
Lubrificante	Estearato de magnésio	Estearato de magnésio
Tensioativo	Lauril Sulfato de Sódio	X
Desagregante	Croscarmelose de sódio	X

X – Categoria não utilizada

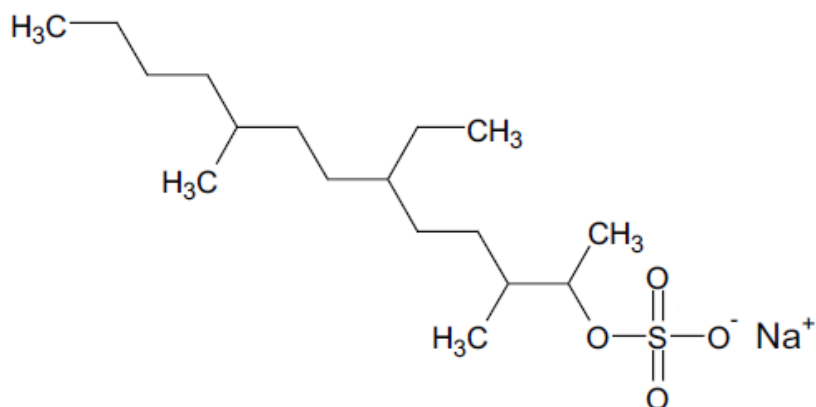


Figura 3.6 - Representação esquemática do lauril sulfato de sódio, [57]

3.4.2 Fatores relacionados com o ensaio de dissolução

As condições do ensaio que interferem na taxa de dissolução do fármaco prendem-se com o tipo de equipamento utilizado e com as características do meio de dissolução. Dentro das características do meio de dissolução pode ser referido o pH, a temperatura do meio, entre outros. Relativamente ao tipo de equipamento utilizado, são vários os fatores que podem influenciar a sua *performance* durante ensaio de dissolução, nomeadamente: a agitação aplicada e a vibração do sistema [33]. Na Tabela 3.3, é possível ver de forma resumida alguns dos fatores relacionados com o ensaio de dissolução que podem afetar a taxa de dissolução [1]:

Tabela 3.3 - Fatores Relacionados com o Ensaio que Afetam a Taxa de Dissolução

1. Agitação
2. Composição do Meio de Dissolução: <ul style="list-style-type: none"> • pH • Força Iónica • Viscosidade • Tensão Superficial
3. Temperatura do Meio de Dissolução
4. Volume do Meio de Dissolução
5. Evaporação do Meio de Dissolução

3.4.2.1 Meio de dissolução

A seleção do meio de dissolução irá depender do objetivo do ensaio. No caso particular em estudo, em que o objetivo passa por avaliar a semelhança entre o medicamento teste e o medicamento de referência e pela seleção de um lote para um estudo *in vivo*, os ensaios de dissolução devem mimetizar, o mais possível, as condições fisiológicas do trato gastrointestinal. Este objetivo é conseguido, em parte, pela composição do meio de dissolução [39] [38].

Assim, devem-se escolher meios de dissolução com pH's apropriados que representem os fluidos do TGI [64].

Como referido anteriormente, a solubilidade de fármacos que sejam ácidos ou bases fracas, irá depender das suas constantes de ionização e do pH do meio de dissolução.

Segundo a “*Guideline Dissolution Testing Of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, 1997*”, para simular o ambiente do TGI, o pH do meio deve variar preferencialmente entre 1,2-6,8. Em casos excepcionais e devidamente justificados pode ser utilizado um meio com pH até 8,0 [45].

O pH dos fluidos biológicos apresenta uma grande variação ao longo do TGI. Estas variações estão descritas na Tabela 3.4 e na Figura 3.7 [51].

Tabela 3.4 - Valores Médios de pH em Humanos Saudáveis em Jejum/Após Alimentação ao longo do Trato Gastrointestinal

Localização	pH Médio	Referência
Estômago	1,3/4,9	[51]
Duodeno	6,5/5,4	[51]
Jejuno	6,6/ (5,2-6)	[51]
Íleo	7,4/7,5	[51]

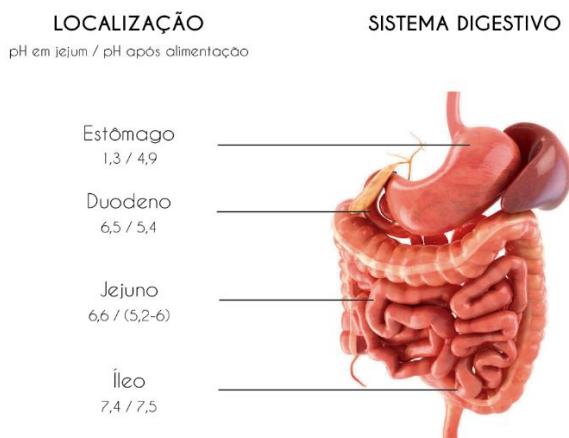


Figura 3.7 - Valores Médios de pH em Humanos Saudáveis em Jejum/Após Alimentação ao longo do Trato Gastrointestinal, Adaptado [65]

Relativamente à **temperatura**, esta deve ser mantida a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para formas farmacêuticas orais como objetivo de simular a temperatura corporal [45].

3.4.2.2 Equipamento, Agitação e Volume

Como referido no ponto 3.3.5, a **seleção do equipamento** a ser utilizado num ensaio de dissolução varia consoante as características da forma farmacêutica do fármaco. Os métodos do cesto de rede e da pá agitadora são principalmente recomendados para formas farmacêuticas sólidas. Consoante a escolha do equipamento alguns parâmetros vão diferir, como é o caso da agitação e do volume [46].

As condições de **agitação** média devem ser mantidas durante todo o ensaio de dissolução sendo que com o uso do método da pá giratória se recomenda uma velocidade de agitação de 50-75 rpm [45].

Quanto ao **volume** do meio utilizado, este pode variar de 500 a 1000 mL, sendo o volume de 900 mL o mais comum [66].

3.4.2.3 Bolhas de Ar

É recomendada a eliminação de bolhas de ar durante os ensaios de dissolução, uma vez que a presença destas pode influenciar os resultados obtidos. As bolhas de ar ou gases dissolvidos presentes no meio de dissolução podem associar-se às partículas e diminuir o contacto do soluto com o solvente [66]. De forma a eliminar as bolhas de ar, deve-se desgaseificar o meio de dissolução no aparelho de ultrassons antes de se dar início ao ensaio de dissolução.

3.4.2.4 Vibração do Sistema

A vibração do sistema pode levar a variações no fluxo hidrodinâmico bem como causar um aumento da energia do sistema. Ambos os efeitos podem levar a alterações da taxa de dissolução pelo que são indesejáveis [33]. São inúmeras as fontes de vibração que podem existir no ambiente do laboratório, como por exemplo banhos ultrassónicos, centrifugadoras, agitadores mecânicos e impressoras. Atendendo a este facto, o equipamento de dissolução não deverá estar posicionado próximo dos equipamentos anteriormente referidos [67].

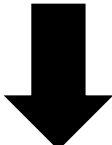
3.4.2.5 Posição e Método de Amostragem

As amostras devem ser retiradas a meia distância da superfície do líquido e a uma distância de, pelo menos, 10 mm da parede do recipiente [68].

3.4.3 Fatores relacionados com a forma farmacêutica

Para que a maioria das formas farmacêuticas sejam eficazes, têm que ser absorvidas para a circulação sistêmica para posteriormente serem transportadas até ao seu local de ação [46]. O tipo de forma farmacêutica oral irá influenciar o número de possíveis etapas desde a administração do fármaco até este ser absorvido. Certas formas farmacêuticas, como é o caso das soluções, não passam pela etapa de dissolução para serem absorvidas podendo ser a sua absorção mais rápida e completa. Já os comprimidos revestidos, antes de iniciarem o processo de dissolução, passam por um processo de desagregação mais lento.

A biodisponibilidade de um fármaco será tanto mais rápida quanto menor for o número de etapas envolvidas desde a sua toma até à sua absorção. Na Tabela 3.5 pode observar-se, por ordem decrescente, a velocidade da biodisponibilidade de diferentes formas farmacêuticas [1].

Tabela 3.5 - Biodisponibilidade das Diferentes Formas Farmacêuticas	
Biodisponibilidade Mais Rápida	Soluções
	Suspensões
	Cápsulas
	Comprimidos
	Comprimidos Revestidos
Biodisponibilidade Mais Lenta	

3.5 Correlações *In Vitro-In Vivo*

A dissolução de fármacos administrados por via oral é pré-requisito para a sua absorção e eficácia clínica. Esta constatação fornece a base para as tentativas de estabelecer correlações entre a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de medicamentos, denominadas de correlações *in vitro-in vivo*. As correlações *in vitro-in vivo* referem-se ao estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas produzidas por uma forma farmacêutica, e as suas propriedades ou características físico-químicas. O estabelecimento deste tipo de correlação de dados pode possibilitar a substituição dos estudos *in vivo*, necessários para avaliação da biodisponibilidade de medicamentos, por estudos *in vitro* bem como servir de suporte aos “*biowaivers*” (medicamentos que são aprovados sem recurso a estudos *in vivo*) [69]. A probabilidade de obtenção de uma correlação *in vitro-in vivo* é maior quando o processo limitante da absorção do fármaco é a dissolução, o que acontece para fármacos pertencentes à classe biofarmacêutica II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) [70].

3.6 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica, foi introduzido em 1995 e representa uma estrutura científica para a classificação dos fármacos com base na sua solubilidade e permeabilidade intestinal [71]. Um dos objetivos do BCS é reduzir o número de estudos de bioequivalência *in vivo* substituindo-os por testes de dissolução *in vitro* [16].

De acordo com o sistema BCS para medicamentos de liberação imediata, os fármacos podem ser classificados em quatro classes sendo que esta classificação pretende correlacionar a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo*, tal como pode ser observado na Tabela 3.6 [72].

Para fármacos pertencentes à classe II do sistema BCS, como é o caso do telmisartan, a liberação do fármaco e a solubilização do mesmo no trato gastrointestinal é a etapa limitante no processo de absorção. Assim, ao aumentar a solubilidade de fármacos pertencentes a esta classe poderá ser também possível aumentar também a sua biodisponibilidade [25, 73].

Tabela 3.6 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica, Adaptado de [74]

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Parâmetro limitante à absorção do fármaco	Expetativa de CIVIV
I	Alta	Alta	Esvaziamento Gástrico	É esperada uma CIVIV se a velocidade de dissolução for mais lenta que a velocidade de esvaziamento gástrico
II	Baixa	Alta	Dissolução	CIVIV esperada se a velocidade de dissolução <i>in vitro</i> for semelhante a <i>in vivo</i>
III	Alta	Baixa	Permeabilidade	É esperada uma CIVIV limitada ou inexistente
IV	Baixa	Baixa	Varia de caso para caso	É esperada uma CIVIV limitada ou inexistente

3.7 Métodos Cromatográficos

Os dois métodos mais comuns para analisar as amostras de um ensaio de dissolução são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectroscopia (UV) [42].

De acordo com a definição da IUPAC, a cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. Esta separação é baseada na migração diferencial dos componentes dessa mistura, que ocorre devido às diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária.

Na cromatografia, os componentes da amostra passam através de um meio com o qual interagem, a fase estacionária, e são arrastados por um fluido, a fase móvel.

As moléculas na amostra possuem diferentes afinidades e interações com a fase estacionária, conduzindo à sua separação. Os componentes da amostra que exibam interações mais fortes com a fase estacionária irão mover-se mais lentamente através da coluna, do que os componentes com interações mais fracas. Desta forma, os diferentes compostos podem ser separados à medida que se movem através da coluna [75].

O termo cromatografia surgiu no ano de 1906, fruto do trabalho do botânico russo Mikhael Semenovitch Tswett, que conseguiu separar pigmentos de cloroplastos em folhas verdes de plantas, utilizando uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, ocorrendo a separação dos componentes em faixas coloridas. Assim, Tswett resolveu denominar esta técnica por cromatografia, junção das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphie* (escrita), apesar do processo não depender da cor. Tswett foi então o primeiro a compreender e interpretar este processo tal como é aceite atualmente, sendo-lhe assim atribuída a descoberta da cromatografia como técnica analítica.

Ao longo dos anos foram desenvolvidos vários métodos cromatográficos: cromatografia líquida, cromatografia gasosa e cromatografia em camada fina [76].

3.7.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Como já foi referido anteriormente, os dois métodos mais comuns para analisar as amostras de um ensaio de dissolução são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectroscopia (UV). A espectroscopia UV é um método mais rápido, simples e que requer uma menor quantidade de solvente quando comparado com o HPLC. No entanto, o método de HPLC apresenta vantagens particularmente quando há uma interferência significativa dos excipientes ou entre substâncias ativas da formulação, quando é necessário um aumento da sensibilidade e/ou quando há a intenção de automatizar o procedimento do teste de dissolução [42]. Assim, o método utilizado no decurso deste estudo foi a cromatografia líquida de alta eficiência uma vez que o medicamento em estudo possui duas substâncias ativas com comprimentos de onda relativamente próximos: 298 nm (telmisartan) e 270 nm (hidroclorotiazida).

A cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*, representa o culminar da modernização da cromatografia líquida (LC) sendo o tipo mais versátil e mais amplamente usado de cromatografia líquida.

Esta técnica de separação envolve a injeção de um pequeno volume de amostra líquida numa coluna empacotada com partículas porosas (fase estacionária) onde os componentes individuais da amostra vão ser separados devido às várias interações químicas e/ou físicas entre as moléculas e partículas que compõem o empacotamento da coluna sendo transportados ao longo da coluna pela fase móvel. Estes componentes vão sendo arrastados a velocidades diferentes de acordo com as interações com a fase estacionária e com a afinidade com a fase móvel sendo detetados à saída da coluna por um detetor [77]. Os detetores podem ser de UV-VIS, de índice de refração diferencial, fluriométricos, condutividade eletrolítica, conductivimétricos, entre outros [78].

Os componentes básicos de um instrumento de HPLC são, como se pode ver pela Figura 3.8, uma bomba (1), um injetor (2), uma coluna (3), um detetor (4) e um computador (5) [77].

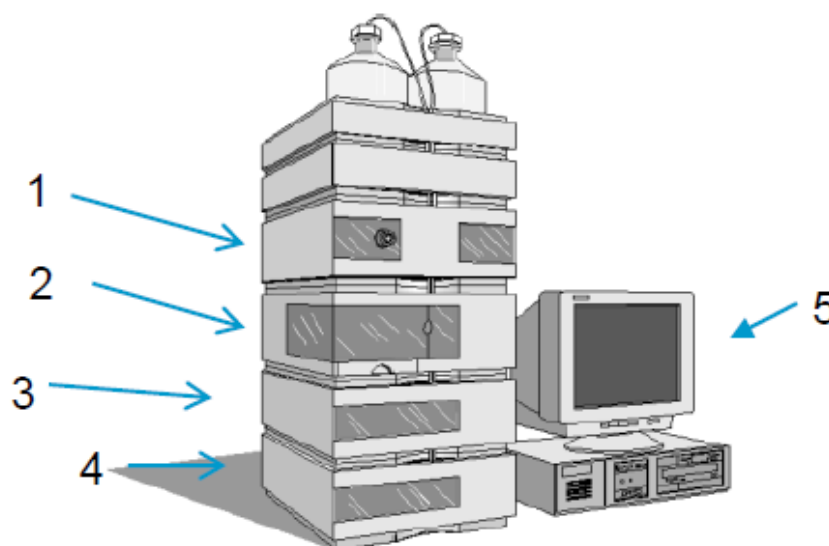


Figura 3.8 - Aparelho de HPLC, [77]

A **bomba** (1) é a peça de equipamento mais crítica para o sucesso da cromatografia líquida de alta eficiência. As bombas são necessárias para fazer fluir a(s) fase(s) móvel(eis) através da fase estacionária a uma taxa de fluxo constante expresso em mililitros por minuto. Uma bomba pode distribuir uma composição constante de fase móvel (isocrática) ou uma composição variável (gradiente) [79].

O **injetor** (2) é responsável pela introdução da amostra na coluna e pode ser automático ou manual. Nos injetores automáticos a amostra é introduzida automaticamente a partir dos *vials* (frascos que contém a amostra preparada para a análise) que se encontram num suporte (suporte com poços onde se colocam os *vial*s) [80].

A **coluna** (3) permite a separação dos componentes de uma mistura. Hoje em dia existe uma enorme variedade de enchimentos, tamanhos e diâmetros internos para as colunas de HPLC, sendo que a escolha da coluna mais adequada vai determinar o sucesso do método analítico em termos de eficiência e seletividade na separação das espécies de interesse [79].

O **detetor** (4) avalia a quantidade de moléculas individuais que saem da coluna de forma a que o analista consiga medir quantitativamente os componentes da amostra. O detetor envia ainda um sinal ao computador que resulta no cromatograma, ou seja, um gráfico de resposta [77].

O **computador** ou processador de dados, não só controla todos os módulos do aparelho de HPLC, como também converte o sinal do detetor e usa-o para determinar o tempo de retenção dos componentes da amostra (análise qualitativa) e a quantidade de amostra (análise quantitativa), apresentando o sinal em forma de cromatograma [77].

3.8 Validação de Métodos

Na indústria farmacêutica, a fiabilidade dos resultados analíticos é crucial para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia dos fármacos [81].

O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que o mesmo é adequado para o fim proposto, ou seja, que o método é digno de confiança.

Os parâmetros exigidos para validar um determinado método analítico variam de acordo com a categoria de ensaio que se pretende desenvolver, sendo os quatro tipos mais comuns de procedimentos analíticos: testes de identificação, testes quantitativos de impurezas, testes limite para controle de impurezas, testes quantitativos de grupo funcional em amostras de matéria-prima ou de produto final ou de outros(s) componente(s) do produto final [82].

Todas as especificações para a validação de métodos analíticos foram sujeitas a uma harmonização levada a cabo pela *International Conference on Harmonization* (ICH) [81]. No presente estudo, os parâmetros necessários à validação do método foram avaliados segundo a norma “*Validation of analytical procedures: Definitions and Terminology*”. A Tabela 3.7 descreve os parâmetros a determinar, consoante o âmbito do procedimento analítico a realizar [83].

Tabela 3.7 – Exigências de Validação de Métodos Analíticos de Acordo com a ICH

Tipo de Procedimento Analítico				
Características	Identificação	Impurezas		Dissolução Conteúdo/Potência
		Quantitativo	Limites	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão				
<i>Repetibilidade</i>	-	+	-	+
<i>Precisão Intermédia</i>	-	+(1)	-	+(1)
Especificidade ⁽²⁾	+	+	+	+
Limite de Detecção	-	-(3)	+	-
Limite de Quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Gama de Trabalho	-	+	-	+

(-) significa que esta característica não é normalmente avaliada

(+) significa que esta característica é normalmente avaliada

(1) Se for feita reprodutibilidade não é preciso fazer precisão intermédia

(2) A falta de especificidade pode ser compensada por outros resultados de validação

(3) Pode ser necessária em determinados casos

No presente estudo pretende-se validar um método analítico que permita quantificar a substância ativa telmisartan em ensaios de dissolução. Para este efeito, de acordo com a Tabela 3.7, foram estudados os parâmetros de exatidão, precisão, especificidade, linearidade, gama de trabalho e, ainda que, não enunciado, a estabilidade das soluções.

3.8.1 Gama de Trabalho

Segundo a ICH, a gama de trabalho deriva dos estudos de linearidade e depende da aplicação pretendida do procedimento. Define-se como sendo o intervalo entre a concentração mais baixa e a concentração mais alta do analito da amostra, para o qual se verifica que o procedimento analítico tem um adequado nível de linearidade, precisão e exatidão [83].

3.8.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade do procedimento analítico obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostra, dentro de uma determinada gama de trabalho [83].

De forma a provar a linearidade de um método analítico devem ser consideradas algumas premissas:

- Devem ser testados 5 níveis de concentração;
- As concentrações devem estar distribuídas ao igualmente ao longo da gama de trabalho;
- Os padrões devem ser preparados no mesmo meio que a amostra (sempre que aplicável);
- O número de leituras por nível deverá ser o mesmo que as que serão realizadas em rotina.

A avaliação da linearidade é feita com base na inspeção visual do gráfico e na determinação do coeficiente de determinação (r^2) da equação da reta de calibração obtida e requer os cálculos do desvio padrão residual, desvio padrão do declive, desvio padrão da ordenada na origem, dos intervalos de confiança e ainda a visualização do gráfico dos resíduos [82].

3.8.3 Especificidade

A especificidade avalia a capacidade de um método analítico para discriminar o analito de outras substâncias presentes na amostra. Alguns exemplos de interferentes de análise são compostos adicionados (por exemplo excipientes), impurezas e produtos de degradação. Diz-se que um método é específico quando se tem garantia que a grandeza medida provém apenas do analito, ou seja, deve haver uma separação completa dos picos do analito em análise dos picos dos restantes compostos [82].

3.8.4 Precisão

Representa a dispersão dos resultados obtidos e correspondentes a várias análises sobre uma mesma amostra ou amostras semelhantes, em condições definidas. É uma medida do grau de repetibilidade ou de reprodutibilidade do método analítico e reflete o grau de proximidade entre valores, para um certo número de análises e para o mesmo método analítico. Este parâmetro é expresso em termos de coeficiente de variação (CV)/desvio padrão relativo (RSD).

São considerados 3 níveis de precisão [84]:

1. Repetibilidade
 - Repetibilidade do equipamento
 - Repetibilidade do método
2. Precisão Intermédia
3. Reprodutibilidade

3.8.4.1 Repetibilidade

Expressa a precisão usando as mesmas condições de análise, o mesmo analista e o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e num curto intervalo de tempo. A **repetibilidade do equipamento** traduz a precisão do equipamento ou a repetibilidade da injeção e é feita analisando a mesma solução, normalmente correspondendo à concentração de 100% da gama de trabalho, um certo número de vezes (por exemplo, 6).

A **repetibilidade do método** consiste em analisar num curto espaço de tempo diferentes alíquotas de uma amostra homogênea cada uma delas preparada e processada de maneira independente ou, em alternativa, poderão ser analisadas matrizes fortificadas. As concentrações em estudo deverão corresponder aos extremos e aos 100% da gama de trabalho e por concentração deverão ser processadas e analisadas três réplicas independentes [84].

3.8.4.2 Precisão Intermédia

A **precisão intermédia** é determinada fazendo a mesma análise em dias diferentes, com analistas diferentes, equipamentos diferentes, mas equivalentes, no mesmo laboratório. Refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra ou amostra idêntica utilizando o mesmo método e o mesmo laboratório, mas variando duas ou mais condições.

O estudo da precisão intermédia tem como objetivo assegurar que o método fornecerá os mesmos resultados quando amostras similares forem analisadas em outros dias ou outros equipamentos equivalentes, e por analistas diferentes. O número de amostras ou matrizes fortificadas a analisar em cada dia será idêntico.

O estudo da precisão intermédia pode ser substituído pelo estudo de **reprodutibilidade** entre dois laboratórios [84].

3.8.5 Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o resultado obtido e o verdadeiro valor e é definida em termos das percentagens de recuperação do analito, juntamente com os intervalos de confiança e a precisão. Existem diferentes métodos para medir a exatidão de um método analítico: aplicação do método analítico a um analito de referência com concentração conhecida, comparação dos resultados obtidos entre o método a validar e um outro já implementado cuja exatidão é conhecida, fortificação da matriz sem analito e finalmente pela técnica de adição do padrão. No presente estudo o método utilizado foi o primeiro enunciado.

A percentagem de recuperação é dada pela Equação 3.9:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{obs}}{C_{ref}} * 100$$

Equação 3.9

Em que C_{obs} representa a concentração recuperada do analito na solução de referência e C_{ref} a concentração conhecida do analito na solução de referência [83, 84].

3.8.6 Estabilidade

Durante a validação de um método analítico, é recomendável haver um estudo que evidencie a estabilidade das soluções durante o tempo necessário à análise. A estabilidade de uma solução entende-se pela capacidade da solução, após um determinado período de tempo, fornecer uma resposta com uma variação inferior a um valor pré-definido relativamente à resposta obtida no tempo zero. Deve ser analisada a estabilidade da substância ativa na solução padrão e nas soluções amostras. Este estudo é efetuado de forma a definir as condições ótimas de armazenamento e o tempo durante o qual as soluções se mantêm inalteradas. Devem ser testadas diferentes condições de armazenamento, como por exemplo armazenamento à temperatura ambiente e em frigorífico, e as soluções devem ser analisadas em vários períodos de tempo adequados à duração do ensaio [84].

4. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Na presente dissertação começou-se por validar um método analítico para quantificar a substância ativa telmisartan presente em diferentes ensaios de dissolução de forma fazer-se um estudo comparativo entre o medicamento teste e o medicamento de referência. O método analítico foi validado de acordo com a norma “*Validation of analytical procedures: Definitions and Terminology*”. Foram estudados 9 lotes do medicamento teste e 3 lotes do medicamento de referência (Micardis Plus®). Todo o desenvolvimento experimental foi realizado nos laboratórios da Sofarimex. Na Tabela 4.1 são apresentados os lotes estudados e a respetiva dosagem.

Tabela 4.1 - Lotes estudados

Lotes Medicamento Teste	Dosagem
50216	40/12,5 mg TEL/HCTZ
50217	40/12,5 mg TEL/HCTZ
50218	40/12,5 mg TEL/HCTZ
50219	80/12,5 mg TEL/HCTZ
50220	80/12,5 mg TEL/HCTZ
50221	80/12,5 mg TEL/HCTZ
40245	80/25 mg TEL/HCTZ
50209	80/25 mg TEL/HCTZ
50210	80/25 mg TEL/HCTZ
Lotes Medicamento de Referência (Micardis Plus®)	Dosagem
544200	40/12,5 mg TEL/HCTZ
502430	80/12,5 mg TEL/HCTZ
208030	80/25 mg TEL/HCTZ

4.1 Composição do Medicamento Teste

Na Tabela 4.2 são apresentadas as quantidades de substâncias ativas e excipientes presentes nas diferentes dosagens dos comprimidos em estudo.

Tabela 4.2 - Composição Comprimidos Telmisartan/Hidroclorotiazida

API/Excipientes	Dosagem 80/25 mg	Dosagem 80/12,5 mg	Dosagem 40/12,5 mg
Telmisartan	80	80	40
Excipientes ¹	644	644	322
Mistura Telmisartan	724	724	362
Hidroclorotiazida	25	12,5	12,5
Excipientes	375	187,5	187,5
Mistura Hidroclorotiazida	400	200	200
Massa Total	1124	924	562

¹ os excipientes utilizados na formulação do telmisartan são enunciados no ponto 3.4.1.4.

4.2 Reagentes

- Água Milli-Q da Milipore
- Acetonitrilo ≥99.9% da Merck
- Ácido Clorídrico ≥37% da Sigma-Aldrich
- Ácido Fosfórico 85% da Merck
- Fosfato de Amônio Monobásico da Panreac
- Hidróxido de Sódio da Eka
- Metanol da Carlo Erba

4.3 Material

- Almofariz
- Balões Volumétricos de 10 mL, 25 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL, 5000 mL, 10000 mL
- Espátula
- Filtros de Papel nº 41 da VWR
- Frascos de Vidro

- Funis
- Pipetas Pasteur Descartáveis
- Pipetas Volumétricas
- Seringas
- Tubos de Centrífuga
- Vials

4.4 Equipamento

- Agitador Mecânico da Vibromatic
- Aparelho de Dissolução da Erweka
- Aparelho de Ultrassons da VWR
- Balança Analítica com precisão $\pm 0,20$ mg da Metter Toledo
- Balança Microanalítica com precisão $\pm 0,1$ μ g da Metter Toledo (Figura 4.2)
- Centrífuga da Thermo Scientific
- Coluna cromatográfica, Luna C₈ 100^a de 125 x 4 mm de 5 μ m (utilizada no ensaio de doseamento)
- Coluna cromatográfica, Ascentis Express C₈ de 5 cm x 3 mm de 5 μ m (utilizada nos ensaios de dissolução)
- Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Agilent Technologies, modelo 1200 Series, detetor UV, refrigerado, injeção automática e sistema de aquisição de dados
- Placa de Agitação Magnética
- Potenciômetro da Methrohm

4.5 Métodos

4.5.1 Dissolução

Todos os ensaios de dissolução foram realizados de acordo com os critérios da “*Guideline On The Investigation Of Bioequivalence, 2010*”.

Submeteram-se 12 unidades do produto, individualmente, a um conjunto de condições previamente definidas. Como é possível observar a partir da Figura 4.1, o equipamento é composto por 6 copos pelo que para cada lote se teve que realizar dois ensaios (12 unidades). As condições de ensaio para os diferentes lotes encontram-se na Tabela 4.3.



Figura 4.1 - Aparelho Utilizado nos Ensaios de Dissolução

Tabela 4.3 – Condições Experimentais dos Ensaios de Dissolução

Aparelho de Dissolução	Aparelho da Pá Giratória
Meio de Dissolução	<ul style="list-style-type: none"> Ácido Clorídrico 0,1 N (pH 1,2) Tampão Acetato, pH 4,5 Tampão Fosfato de Potássio, pH 6,8 Tampão Fosfato de Potássio, pH 7,5
Temperatura	37±0,5°C
Tempos de Recolha	5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos
Velocidade	75 rpm
Volume do Meio	900 mL

4.5.1.1 Preparação das Soluções para os Ensaios de Dissolução

- Solução de Hidróxido de Sódio 0,1 M: pesar rigorosamente cerca de 0,4 g de hidróxido de sódio para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 80 mL de água purificada e agitar bem até completar a dissolução. Perfazer o volume com o mesmo solvente e agitar bem manualmente.
- Solvente A (hidróxido de sódio 0,005 M): pipetar 10 mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 M para um balão volumétrico de 200 mL. Perfazer o volume com metanol e agitar bem manualmente.

- Fase Móvel A: pesar rigorosamente cerca de 4,0 g de fosfato de amônio monobásico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) para um balão volumétrico de 2000 mL. Adicionar 1900 mL água purificada e agitar bem até completar a dissolução. Ajustar o pH a $3,00 \pm 0,05$ com ácido fosfórico a 85% e perfazer o volume com o solvente A. Agitar bem manualmente e filtrar através de filtros de membrana (celulose regenerada) 0,45 μm .

- Fase Móvel B: Acetonitrilo

- Solução Padrão Stock:

1. Dosagem 80/25 mg telmisartan/hidroclorotiazida

Pesar rigorosamente cerca de 44,4 mg de telmisartan padrão a 100% e 13,90 mg de hidroclorotiazida padrão a 100% para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 70 mL de solvente A e agitar bem até completar a dissolução. Perfazer o volume com o mesmo solvente e agitar bem manualmente.

($C_{\text{Telmisartan}} = 0,444 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Hidroclorotiazida}} = 0,139 \text{ mg/mL}$)

2. Dosagem 80/12,5 mg telmisartan/hidroclorotiazida

Nesta dosagem em vez de se pesarem 13,90 mg de hidroclorotiazida, pesam-se 6,95 mg. O restante procedimento é igual ao anteriormente explicado.

($C_{\text{Telmisartan}} = 0,444 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Hidroclorotiazida}} = 0,0695 \text{ mg/mL}$)

3. Dosagem 40/12,5 mg telmisartan/hidroclorotiazida

Pesar rigorosamente cerca de 22,2 mg de telmisartan padrão a 100% e 6,95 mg de hidroclorotiazida padrão a 100% para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 70 mL de solvente A e agitar bem até completar a dissolução. Perfazer o volume com o mesmo solvente e agitar bem manualmente.

($C_{\text{Telmisartan}} = 0,222 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Hidroclorotiazida}} = 0,0695 \text{ mg/mL}$)

Solução Padrão: pipetar 1 mL da solução padrão stock para um balão volumétrico de 10 mL e perfazer o volume com o meio de dissolução. Agitar bem manualmente.



Figura 4.2 - Balança Micro Analítica Utilizada na Pesagem dos Padrões

Solução Amostra: colocar 900 mL de meio de dissolução em cada um dos copos do equipamento de dissolução. Ligar o aparelho, esperar que a temperatura atinga os $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. De seguida, colocar 1 comprimido em cada copo e pôr o aparelho a funcionar à velocidade 75 rpm. Retirar e filtrar 10 mL de cada copo de dissolução ao fim de cada um dos tempos de recolha especificados na Tabela 4.3. Pipetar 5 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 10 mL e perfazer o restante volume com o meio de dissolução. Agitar bem. Na Figura 4.3 e na Figura 4.4 é possível observar as etapas descritas.



Figura 4.3 - Frascos para Recolha das Amostras



Figura 4.4 - Diluição das Amostras Retiradas de cada Copo nos Diferentes Tempos de Recolha

4.5.1.2 Preparação dos Meios de Dissolução

De forma a avaliar a libertação da substância ativa (telmisartan) nos diferentes lotes em condições que mimetizam o trato gastrointestinal, foram realizados perfis de dissolução em 4 meios de dissolução diferentes: HCl 0,1 N pH 1,2, tampão acetato (pH 4,5), tampão fosfato (pH 6,8) e tampão fosfato (pH 7,5).

Os meios de dissolução foram preparados de acordo com a USP e na Tabela 4.4. é apresentada a descrição do modo de preparação.

Tabela 4.4 – Preparação dos Meios de Dissolução

Meio de Dissolução	Preparação
HCl 0,1 N, pH=1,2	Para um balão de 5 L retirar 43 mL de HCl fumante a 37%. Perfazer o volume com água destilada. Agitar bem.
Tampão Acetato, pH=4,5	Num balão de 10 L dissolver 63 g de acetato de sódio em água destilada e adicionar 90 mL de ácido acético 2 M. Ajustar o pH e perfazer o restante volume com água destilada. Agitar bem.
Tampão Fosfato, pH=6,8	Num balão de 10 L colocar 68 g de fosfato de potássio monobásico 0,2 M e 9 g de hidróxido de sódio 0,2 M. Perfazer o volume com água destilada. Agitar bem.
Tampão Fosfato, pH=7,5	Num balão de 10 L colocar 68 g de fosfato de potássio monobásico 0.2 M e 16,70 g de hidróxido de sódio 0,2 M. Perfazer o volume com água destilada. Agitar bem.

4.5.1.3 Condições Cromatográficas

A metodologia utilizada para quantificar o telmisartan nos vários ensaios de dissolução, foi desenvolvida e validada com base no descrito na monografia “*Telmisartan and Hydrochlorothiazide*”.

As condições cromatográficas de trabalho para a determinação do telmisartan nos vários ensaios de dissolução são:

- Coluna: Ascentis Express C₈ 5 cm x 3.0 mm 5 µm (Supelco – Cat: 50377-U)
- Comprimento de Onda: 298 nm
- Fase Móvel A: Solução Tampão Dihidrogenofosfato Amônio pH 3,0
- Fase Móvel B: Acetonitrilo
- Temperatura da Coluna: 30°C
- Tempo de Corrida: 9,70 minutos
- Volume de Injeção: 4 µL
- Bomba/Fluxo: Gradiente

Tabela 4.5 – Gradiente Fase Móvel Ensaios Dissolução

Tempo (minutos)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)	Fluxo (mL/min)
0	85	15	0,6
1,5	85	15	0,6
1,51	60	40	0,6
5,00	60	40	0,6
5,01	20	80	1,0
6,20	20	80	1,0
6,21	85	15	0,6
9,70	85	15	0,6

A Equação 4.1 permite determinar a percentagem dissolvida da substância ativa (telmisartan) libertada em cada tempo de ensaio.

$$\% \text{ dissolvida} = \frac{A_A}{A_P} * \frac{M_{pp}}{100} * \frac{1}{10} * P * \frac{(100 - H)}{100} * \frac{V_{meio}}{M_{ta}} * \frac{10}{5} * 100$$

Equação 4.1

Onde A_A é o valor correspondente à média de áreas obtidas para a amostra, A_P à média de áreas obtida para o padrão, M_{ta} à massa teórica de amostra (g), M_{pp} à massa pesada do padrão (mg), P à potência do padrão, H à humidade do padrão (%) e V_{meio} ao volume do meio de dissolução.

Quando se tratam de perfis de dissolução, em cada tempo foi corrigido o volume do meio uma vez que não é feita a compensação do volume retirado.

4.5.2 Doseamento

O ensaio de doseamento permite avaliar se a quantidade de substância(s) ativa(s) no produto acabado está presente na dosagem pretendida. Os métodos cromatográficos são os mais utilizados como métodos de doseamento.

4.5.2.1 Preparação das soluções para o ensaio de doseamento

- Solução de hidróxido de sódio 0,1 M, solvente A (hidróxido de sódio 0,005 M) e fase móvel A: preparadas como descrito no ponto 4.5.1.1.
- Fase Móvel B: Acetonitrilo: Metanol (50:50 v/v)
- Fase Móvel: transferir 500 mL de tampão fosfato pH 3,0, 250 mL de acetonitrilo e 250 mL de metanol para um balão volumétrico de 1000 mL. Agitar bem manualmente.
- Solução Padrão: pesar rigorosamente cerca de 20 mg de telmisartan padrão a 100% e 6,25 mg de hidroclorotiazida padrão a 100% para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 40 mL de solvente A e agitar bem até completar a dissolução. Perfazer o volume com o mesmo solvente e agitar bem manualmente. Pipetar 1 mL da solução padrão anterior para um balão volumétrico de 10 mL e perfazer o volume com fase móvel. Agitar bem manualmente.
($C_{\text{Telmisartan}} = 0,04 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Hidroclorotiazida}} = 0,0125 \text{ mg/mL}$)
- Solução Amostra: pulverizar 20 comprimidos num almofariz (Figura 4.5). Pesar cerca de 1124 mg de pó, equivalente ao peso de 1 comprimido de 80/25 mg TEL/HCTZ para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 80 mL de solvente A e levar ao aparelho de ultrassons durante 5 minutos e posteriormente, agitar mais 30 minutos num agitador mecânico. Perfazer o volume com o solvente A e centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos. Pipetar 1 mL do sobrenadante para um balão volumétrico de 20 mL e perfazer o volume com fase móvel. Agitar bem. Efetuar 2 ensaios.
($C_{\text{Telmisartan}} = 0,04 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Hidroclorotiazida}} = 0,0125 \text{ mg/mL}$)



Figura 4.6 - Amostras a serem centrifugadas



Figura 4.5 – Comprimidos Pulverizados

4.5.2.2 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas de trabalho são:

- Bomba/Fluxo: Gradiente
- Coluna: Luna C₈ 100^a 125 x 4 mm 5 µm
- Comprimento de Onda: 298 nm
- Fase Móvel A: Solução Tampão Dihidrogenofosfato Amônio pH 3,0
- Fase Móvel B: Acetonitrilo/Metanol (50:50 v/v)
- Fluxo: 1,2 mL/min
- Temperatura da Coluna: 40°C
- Tempo de Corrida: 15,5 minutos
- Tempo de Retenção: 8 minutos
- Volume de Injeção: 10 µL

Tabela 4.6 - Gradiente Fase Móvel Ensaio Doseamento

Tempo (minutos)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
0	85	15
3,5	85	15
3,51	45	55
7,70	45	55
7,71	20	80
12,0	20	80
12,1	85	15
15,1	85	15

Deve-se introduzir no aparelho a concentração real do padrão usado, dada pela Equação 4.2.

$$Cr (telmisartan) = \frac{Q_p}{50} * \frac{1}{10} * \frac{P * (100 - H)}{100} * 100 * \frac{20}{1} * \frac{100}{80}$$

Equação 4.2 – Concentração real de padrão

Onde Q_p corresponde ao peso do padrão de telmisartan (mg), P à potência do padrão de telmisartan (mg) e H à humidade do padrão de telmisartan (%).

4.5.3 Validação do Método Analítico para os estudos dos perfis de dissolução

A validação do método analítico para a quantificação de telmisartan nos diferentes ensaios de dissolução teve em consideração os parâmetros especificados no ponto 3.8. Todas as soluções preparadas utilizaram como meio de dissolução tampão fosfato de potássio pH 7,5 (meio de dissolução ótimo do TEL), como especificado na monografia "*Telmisartan and Hydrochlorothiazide*". Todas as soluções amostras utilizadas nos diferentes parâmetros de validação foram preparadas de acordo com o ponto 4.5.1.1 sendo que apenas foi retirada uma amostra ao fim de 45 minutos. As soluções padrão também foram preparadas como descrito no mesmo ponto.

4.5.3.1 Linearidade

Nos ensaios de linearidade foram analisadas 5 soluções padrão na gama entre 20% e 120% (Tabela 4.7), tendo cada solução sido injetada 3 vezes. Para tal, preparou-se inicialmente uma solução padrão da dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ conforme o descrito no ponto 4.5.1.1. A partir desta solução inicial, através de diluições, preparam-se as 5 soluções a testar. Os resultados médios foram relacionados com as respetivas concentrações para elaboração da reta de calibração por regressão linear.

Tabela 4.7 – Níveis de Concentração para o Estudo da Linearidade (formulação 80/25 mg TEL/HCTZ)

Concentração (%)	Telmisartan (µg/mL)	Volume (mL)	Balão Volumétrico (mL)
20	8,89	0,5	250
50	22,22	1	200
80	35,52	2	250
100	44,44	1	100
120	53,33	3	250

4.5.3.2 Especificidade

Para se verificar que os solventes e o placebo não apresentavam picos cromatográficos ao tempo de retenção do telmisartan, foram analisadas as soluções abaixo enunciadas tendo sido injetadas 2 vezes cada uma:

- Fase móvel (85% tampão fosfato de amónio pH=3/15% acetonitrilo)
- Meio de dissolução do telmisartan (fosfato de potássio pH 7,5)
- Solvente de dissolução (como descrito no ponto 4.5.1.1, solvente A)
- Solução Placebo¹
- Solução Padrão da dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ
- Solução Amostra da dosagem 80/25 mg

¹Na preparação da solução placebo pesaram-se 71,56 mg de placebo de TEL e 41,67 mg de placebo de HCTZ para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 80 mL do meio de dissolução do TEL e agitou-se o balão num agitador mecânico durante 15 minutos. Posteriormente, completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se a solução. Pipetaram-se 10 mL da solução filtrada para um balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com o mesmo meio de dissolução. Finalmente, agitou-se manualmente.

4.5.3.3 Precisão

No ensaio da precisão foram avaliados os parâmetros descritos no ponto 3.8.4. Na **repetibilidade do equipamento** preparou-se uma solução amostra (correspondente à concentração de 100% da gama de trabalho) conforme descrito no ponto 4.5.1.1. A solução foi analisada 6 vezes.

Na **repetibilidade do método**, foram preparadas 6 soluções amostra independentes correspondentes às dosagens de 80/25 mg TEL/HCTZ e de 40/12,5 mg TEL/HCTZ. Cada amostra foi injetada 3 vezes.

Para a avaliação da **precisão intermédia**, preparam-se 6 soluções amostra para as formulações correspondentes às dosagens de 80/25 mg TEL/HCTZ e de 40/12,5 mg TEL/HCTZ em dois dias diferentes, em equipamentos diferentes e com diferentes analistas. Cada amostra foi injetada 3 vezes.

4.5.3.4 Exatidão

Para a validação da metodologia em questão, recorreu-se à quantificação das percentagens de recuperação do telmisartan em soluções com diferentes concentrações. A avaliação da exatidão foi efetuada para a formulação 80/25 mg TEL/CZ, através da análise de soluções amostra com

os dois ativos, em quatro níveis de concentração: 25%, 50%, 100% e 120%. Foram triturados 20 comprimidos correspondentes à formulação em estudo e fez-se o seu doseamento de acordo com o ponto 4.5.2. Posteriormente, foram pesadas quantidades relativas aos níveis de concentração em estudo em triplicado, como pode ser visto na Tabela 4.8. Cada amostra foi injetada 3 vezes.

Tabela 4.8 - Níveis de Concentração para o Estudo da Exatidão

Concentração (%)	Telmisartan (mg)	Hidroclorotiazida (mg)
120%	96	30
100%	80	25
50%	40	12,5
25%	20	6,25

4.5.3.5 Estabilidade

Na avaliação da estabilidade foi preparada uma solução padrão (80/25 mg TEL/HCTZ) e duas soluções amostra referentes às dosagens 80/25 mg TEL/HCTZ e 40/12,5 mg TEL/HCTZ com o meio de dissolução do telmisartan, pH 7,5. Cada uma destas soluções foi dividida por 7 *vials*:

- Um *vial* de cada solução foi analisado de imediato;
- Os restantes 6 *vials* de cada solução foram mantidos à temperatura ambiente (3 *vials*) e no frigorífico (3 *vials*) e foram analisados aos tempos de 24h, 48h e 72h;
- As soluções amostra foram quantificadas às 0h, 24h, 48h e 72h, com uma solução padrão no meio de dissolução do telmisartan, preparada diariamente.
- A solução padrão foi quantificada às 24h, 48h e 72h, com uma solução padrão no meio de dissolução do telmisartan, preparada diariamente.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 Validação do Método Analítico

5.1.1 Especificidade

Da Figura 5.1 à Figura 5.6 estão representados os cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do ensaio de dissolução:

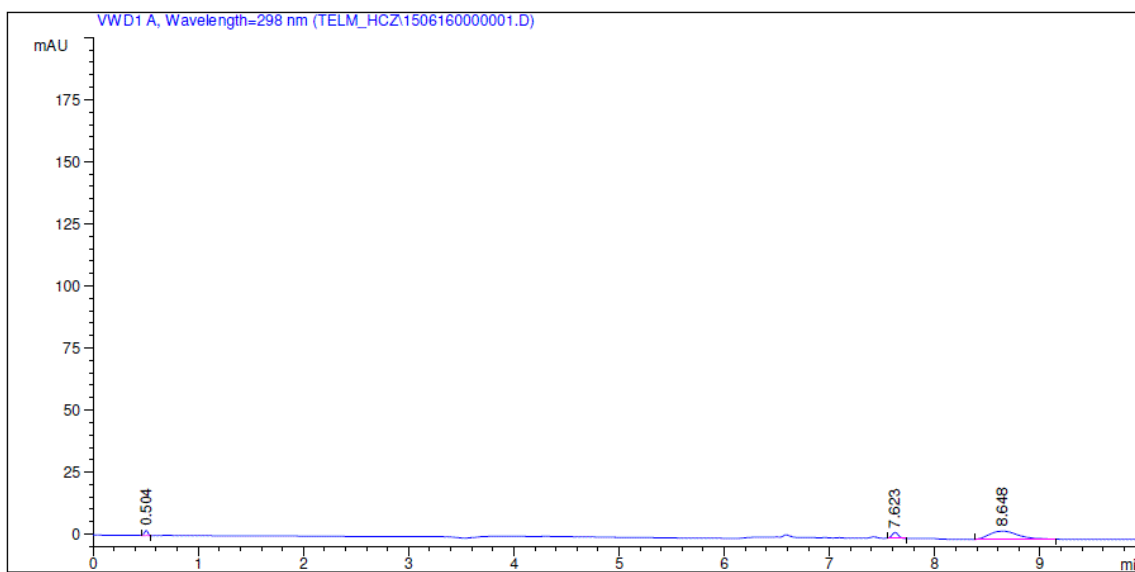


Figura 5.1 - Cromatograma correspondente à fase móvel

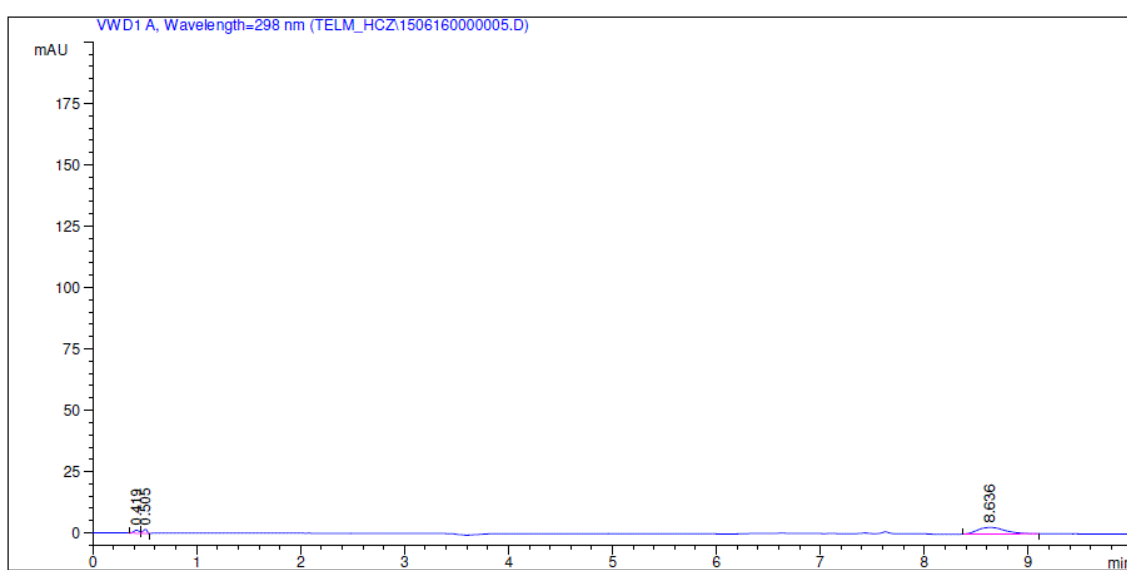


Figura 5.2 - Cromatograma correspondente ao meio de dissolução do telmisartan, pH=7,5

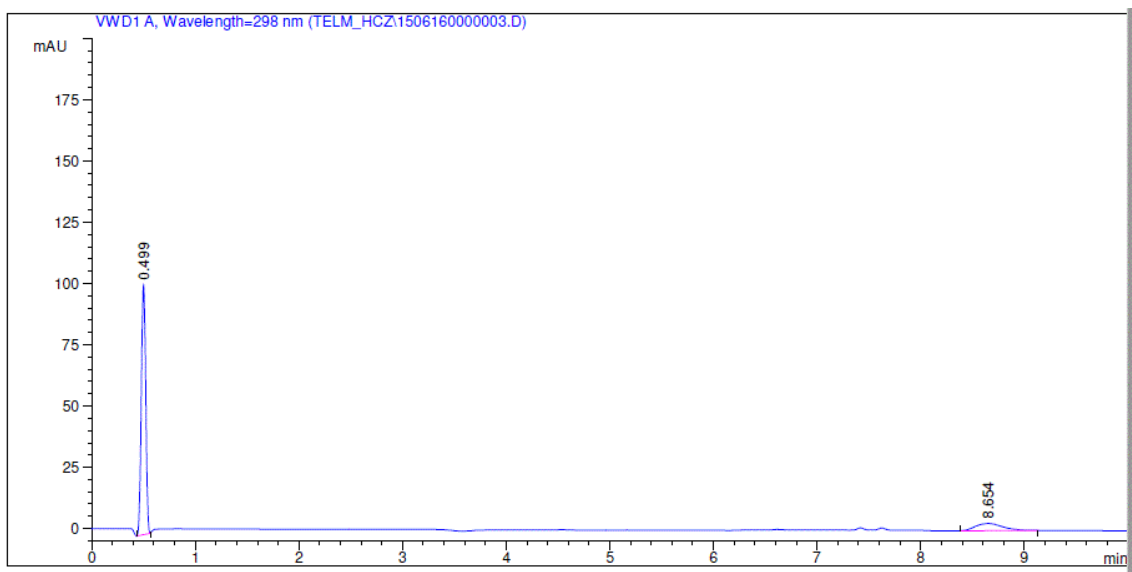


Figura 5.3 - Cromatograma correspondente ao solvente A

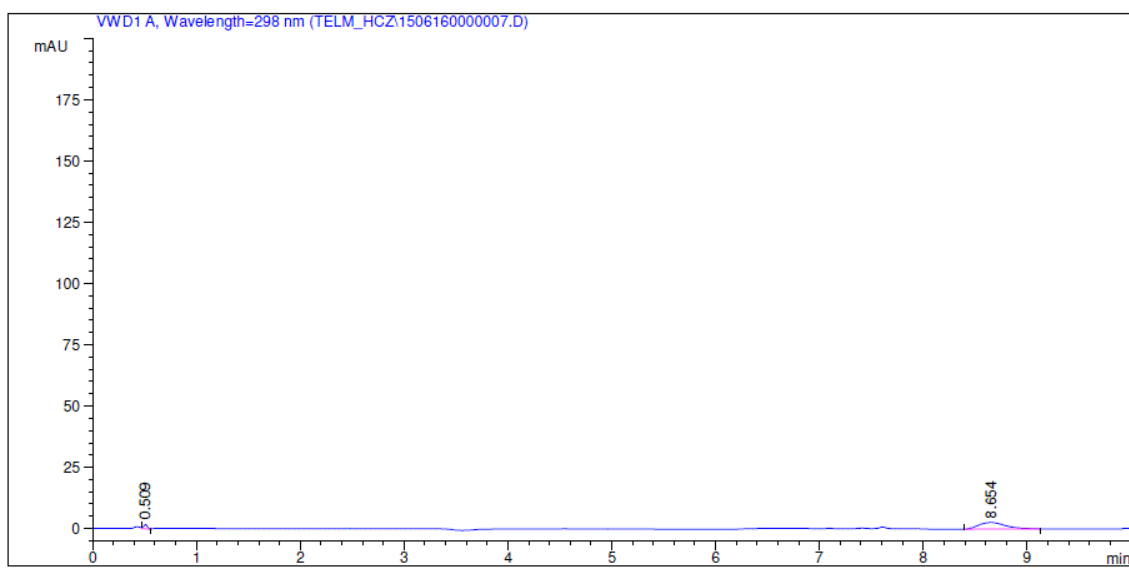


Figura 5.4 - Cromatograma correspondente à solução placebo pH=7,5

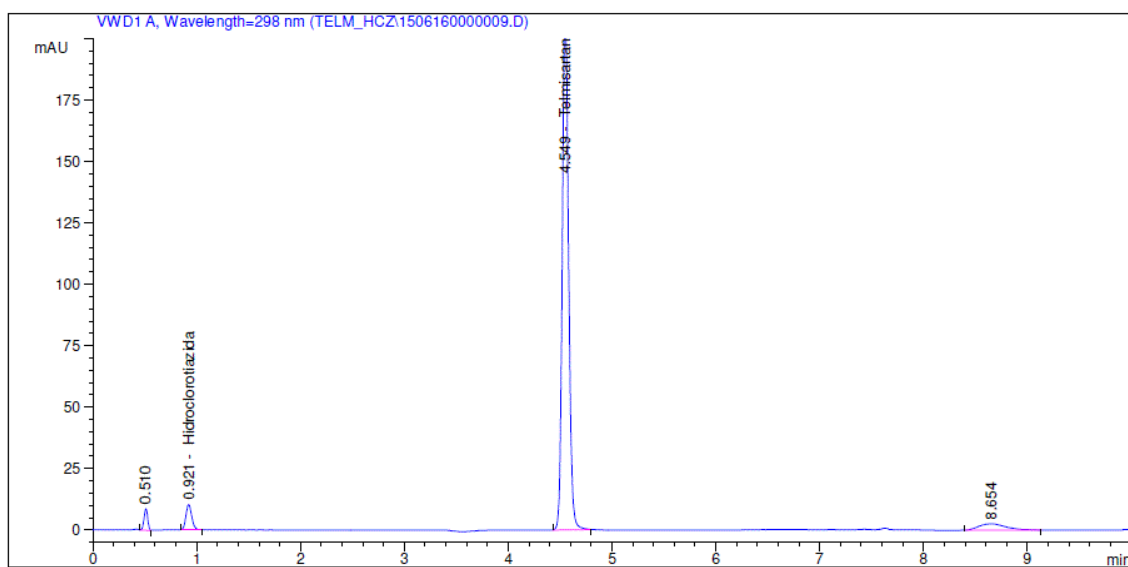


Figura 5.5 - Cromatograma correspondente à solução padrão (80/25 mg TEL/HCTZ) pH=7,5

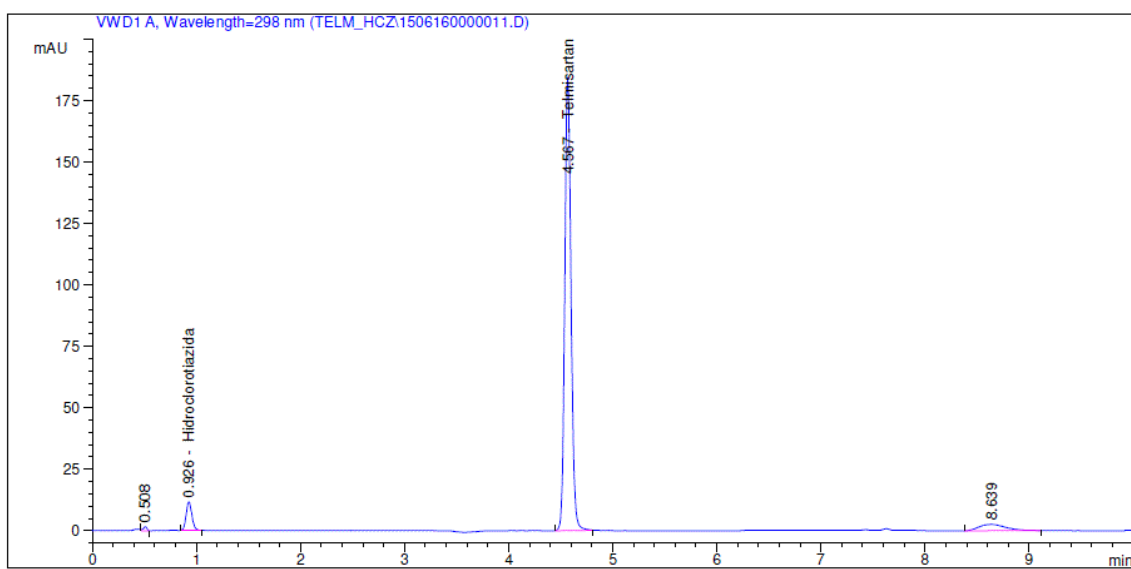


Figura 5.6 - Cromatograma correspondente à solução amostra (80/25 mg TEL/HCTZ) pH=7,5

Verifica-se que o método é específico para o telmisartan uma vez que é cumprido o critério de aceitação definido:

- Não há picos interferentes ao tempo de retenção do telmisartan.

5.1.2 Linearidade e Gama de Trabalho

Na Tabela 5.1 encontram-se as médias das respostas obtidas referentes a cada nível de concentração das soluções padrão e o respetivo valor de RSD (%). Na Figura 5.7 apresenta-se a reta de calibração correspondente ao ativo telmisartan.

Tabela 5.1 - Concentração do padrão e média dos respetivos sinais instrumentais

Concentração (%)	Concentração (µg/ml)	Resposta (mAU*s)	RSD (%)
20	8,91	158,87	0,12
50	22,29	443,38	0,18
80	35,66	668,99	0,60
100	44,57	837,35	0,25
120	53,49	1018,61	0,25

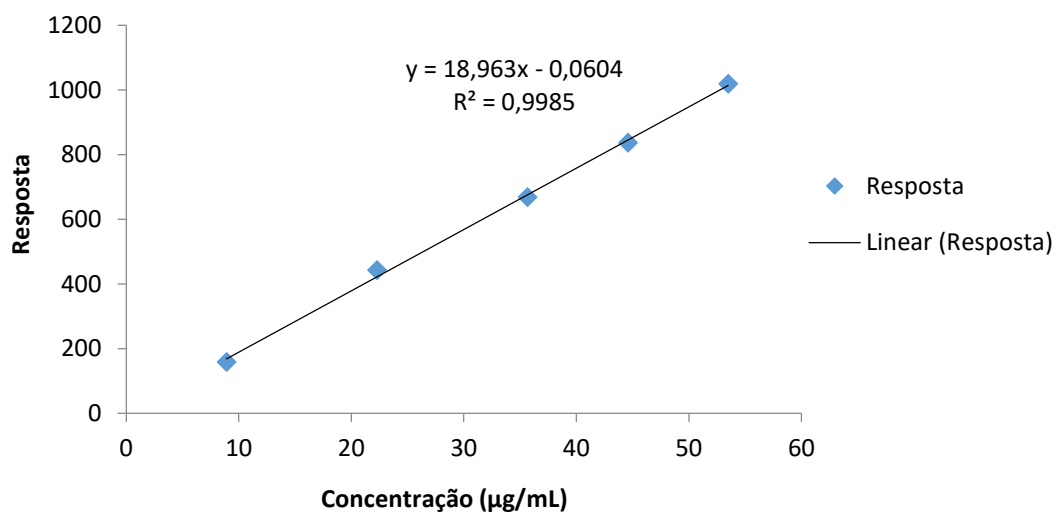


Figura 5.7 - Reta de calibração do Telmisartan

Na Tabela 5.2 é apresentado o resumo dos resultados obtidos para o ensaio de linearidade e na Figura 5.8 a representação gráfica dos resíduos.

Tabela 5.2 - Resultados do ensaio de linearidade (formulação 80/25 mg TEL/HCTZ)

Parâmetro	Resultado
Coeficiente de correlação (r)	0,999
Coeficiente de determinação (r ²)	0,999
Limite de interseção superior no IC _{95%}	48,96
Limite de interseção inferior no IC _{95%}	-49,08
Limite do declive superior no IC _{95%}	0,20
Limite do declive inferior no IC _{95%}	0,18

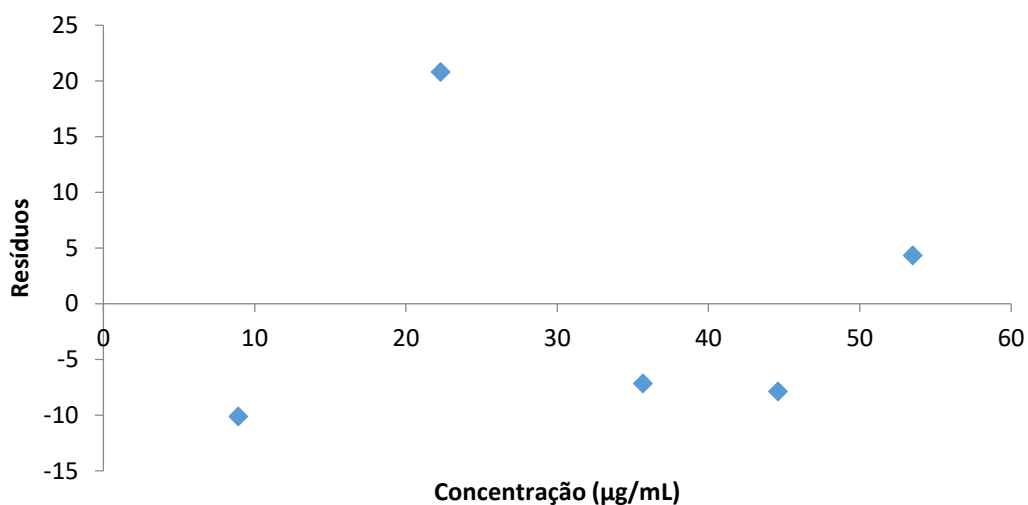


Figura 5.8 - Distribuição residual

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas (8,91 µg/mL a 53,49 µg/mL), cumprindo os critérios de aceitação:

- $r \geq 0,99$, logo o ensaio é válido;
- Os resíduos apresentam uma distribuição aleatória em torno de zero;
- Os limites de interseção, para um IC_{95%}, contêm o zero, pelo que a reta passa na origem;
- Os limites do declive, para um IC_{95%}, não contêm o valor zero indicando que a reta tem declive e por isso proporcionalidade e linearidade.

A gama de trabalho fica estabelecida para o intervalo de concentrações entre 8,91 µg/mL e 53,49 µg/mL, ou seja, dos 20% aos 120% da concentração de trabalho.

5.1.3 Precisão

5.1.3.1 Repetibilidade do Equipamento

Na avaliação da repetibilidade do equipamento foi calculada a média, o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo dos tempos de retenção (TR) e das áreas de seis injeções consecutivas de uma solução amostra da dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ (correspondente à concentração de 100% da gama de trabalho).

Os resultados são apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade do equipamento

Injeção	Área (mAU*s)	TR (min)
1	834,79	4,49
2	840,50	4,49
3	840,10	4,49
4	839,08	4,51
5	843,08	4,51
6	839,65	4,53
Média	839,53	4,50
DP	2,70	0,02
RSD (%)	0,32	0,36

Os resultados do ensaio de repetibilidade do equipamento cumprem o critério de aceitação definido:

- RSD (áreas e tempo de retenção) \leq 2,0%.

5.1.3.2 Repetibilidade do Método

O resumo dos resultados obtidos para a repetibilidade do método para as formulações de 80/25 mg TEL/HCTZ e 40/12,5 mg TEL/HCTZ encontra-se na Tabela 5.4 e na Tabela 5.5. Os resultados foram expressos em termos da média, desvio padrão e desvio padrão relativo entre as 6 amostras.

Tabela 5.4 – Repetibilidade do Método para a formulação 80/25 mg

Amostra (80/25 mg)	Área (mAU*s)
1	838,46
2	811,88
3	831,47
4	833,41
5	839,59
6	818,24
Média	828,84
DP	11,28
RSD (%)	1,36

Tabela 5.5 - Repetibilidade do Método para a formulação 40/12,5 mg

Amostra (40/12,5 mg)	Área (mAU*s)
1	407,35
2	412,03
3	418,05
4	424,35
5	422,30
6	405,94
Média	415,00
DP	7,74
RSD (%)	1,86

Os resultados do ensaio da repetibilidade do método cumprem os critérios de aceitação definidos para ambas as formulações:

- $RSD \leq 3,0\%$ para o total das amostras

5.1.3.3 Precisão Intermédia

Os resultados da precisão intermédia do ensaio para as formulações de 80/25 mg TEL/HCTZ e 40/12,5 mg TEL/HCTZ estão apresentados na Tabela 5.6 e na Tabela 5.7. Os resultados foram expressos em termos da média, desvio padrão e desvio padrão relativo entre as 6 amostras. A totalidade dos resultados foi expressa em termos da média, desvio padrão e desvio padrão relativo entre as 12 amostras.

Tabela 5.6 – Precisão intermédia do ensaio para a formulação 80/25 mg TEL/HCTZ

Concentração (%)		
Amostra	Analista 1/Dia 1/Aparelho 1	Analista 2/Dia 2/Aparelho 2
1	100,14	95,17
2	96,97	95,68
3	99,30	96,02
4	99,54	98,00
5	100,27	97,64
6	97,72	97,25
Média	98,99	96,63
DP	1,35	1,16
RSD (%)	1,36	1,20
Média 12 Amostras	97,81	
DP 12 Amostras	1,72	
RSD (%) 12 Amostras	1,76	

Tabela 5.7 - Precisão intermédia do ensaio para a formulação 40/12,5 mg TEL/HCTZ

Concentração (%)		
Amostra	Analista 1/Dia 1/Aparelho 1	Analista 2/Dia 2/Aparelho 2
1	92,99	92,27
2	94,06	93,20
3	95,44	93,57
4	96,40	92,89
5	92,67	95,27
6	97,72	94,39
Média	94,74	93,60
DP	1,77	1,08
RSD (%)	1,86	1,15
Média 12 Amostras	94,17	
DP 12 Amostras	1,52	
RSD (%) 12 Amostras	1,61	

Os resultados do ensaio de precisão intermédia para a formulação de 80/25 mg TEL/HCTZ e para a formulação de 40/12,5 mg TEL/HCTZ cumprem os critérios de aceitação definidos:

- $RSD \leq 2,0\%$ para cada analista
- $RSD \leq 2,5\%$ para inter-analistas

5.1.4 Exatidão

A Tabela 5.8 apresenta os resultados obtidos para a exatidão do ensaio testada a quatro níveis de concentração. A sua avaliação foi efetuada através do cálculo da percentagem de recuperação do ativo. Os resultados foram expressos em termos da média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Tabela 5.8 - Resultados para o ensaio de exatidão

Nível de Concentração	25%	50%	100%	120%
Recuperação (%)	99,32	99,67	101,92	101,28
	97,39	100,57	98,54	103,05
	99,69	102,27	101,53	101,00
Média	98,80	100,84	100,66	101,78
DP	1,24	1,32	1,85	1,11
RSD (%)	1,25	1,31	1,84	1,09
12 Determinações				
Média (%)	100,52			
DP	1,65			
RSD (%)	1,64			

Os resultados do ensaio de exatidão cumprem o critério de aceitação definido para a recuperação nos quatro níveis de concentração estudados:

- A percentagem de recuperação de telmisartan em cada uma das concentrações e na média das 12 determinações encontra-se entre os limites: 95% -105%.

5.1.5 Estabilidade

Na Tabela 5.9 são apresentados os resultados obtidos no ensaio de estabilidade do telmisartan.

Tabela 5.9 - Resumo dos resultados obtidos para o ensaio de estabilidade do telmisartan

Temperatura	Ambiente			Refrigerada		
Tempo (h)	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Solução Padrão (80/25 mg TEL/HCTZ) (%)	101,61	102,50	102,24	101,37	102,48	101,71
Variação (%)	-1,61	-2,50	-2,24	-1,37	-2,48	-1,71
Solução Amostra (80/25 mg TEL/HCTZ) (%)	98,30	100,99	100,12	98,27	101,40	100,56
Variação (%)	1,70	-0,99	-0,12	-1,73	-1,40	-0,56
Solução Amostra (40/12,5 mg TEL/HCTZ) (%)	99,86	99,50	97,86	97,26	98,39	98,13
Variação (%)	-0,14	0,50	2,14	2,74	1,61	1,87

Perante os resultados do ensaio:

- As soluções padrão são estáveis por um período de 72h à temperatura ambiente e refrigerada uma vez que a variação é inferior a 3%.
- As soluções amostras são estáveis por um período de 72h à temperatura ambiente e refrigerada uma vez que a variação é inferior a 3%.

5.2 Resultados dos Ensaio de Dissolução

Neste subcapítulo serão avaliados os resultados obtidos dos perfis de dissolução dos diferentes lotes apresentados na Tabela 4.1.

O estudo dos perfis de dissolução englobou duas etapas:

- Estudo do perfil de dissolução de 3 lotes de cada dosagem do produto teste nos diferentes meios de dissolução enunciados na Tabela 4.4 de forma a avaliar a consistência e homogeneidade dos lotes produzidos e de um lote de cada dosagem do produto de referência nos mesmos meios;
- Avaliação da similaridade entre os lotes do medicamento teste e o medicamento de referência nos diferentes meios de dissolução, através do cálculo do fator similaridade (f_2), segundo os critérios da *"Guideline On The Investigation Of Bioequivalence, 2010"*, enunciados no ponto 3.3.4.

Os resultados obtidos para cada um dos meios de dissolução foram expressos em termos de percentagem média de substância ativa dissolvida ao longo do tempo para 12 unidades, estando apresentados nas tabelas e gráficos abaixo.

5.2.1 Meio de Dissolução: HCl 0,1 N (pH 1,2)

5.2.1.1 Formulação 80/25 mg TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução para o telmisartan da dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ em HCl 0,1 N pH 1,2 representados na Figura 5.9 apresentam valores de dissolução inferiores a 85% ao fim de 15 minutos para ambos os produtos (teste e referência). Assim, recorreu-se ao cálculo do fator de similaridade (f_2). Os valores obtidos, apresentados na Tabela 5.11, foram 19,94, 17,39 e 17,18 para os lotes 40245, 50209 e 50210 respetivamente, o que indica que os produtos não são semelhantes já que o valor de f_2 não se encontra no intervalo entre 50-100. Apesar de ambos os produtos (teste e referência) terem apresentado dissoluções lentas ao fim de 15 minutos, verificou-se que o produto de referência apresentou uma taxa de dissolução maior ao fim do tempo de ensaio quando comparado com os lotes teste. É ainda possível observar pela Tabela 5.10, que os valores de RSD para os lotes do produto teste são superiores a 10% ao fim de 10 minutos não cumprindo o critério especificado no ponto 3.3.4. No entanto, estes resultados não são devido a uma dispersão anormal dos resultados individuais dos comprimidos, mas sim ao facto do valor médio ser bastante baixo.

Tabela 5.10 – Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/25 mg em HCl 0,1 N pH 1,2

Tempo (minutos)	Lotes							
	40245		50209		50210		208030	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	8,39	11,80	7,10	8,30	6,60	11,20	20,59	9,60
10	15,07	15,50	12,78	11,80	11,54	11,60	41,18	6,00
15	20,50	14,30	16,37	12,50	15,90	11,80	57,41	5,80
20	25,14	14,40	20,50	11,40	19,39	10,60	70,11	3,70
30	32,58	11,80	26,15	10,60	20,06	10,90	83,66	4,70
45	41,72	10,70	33,50	10,20	33,70	8,50	93,98	2,90

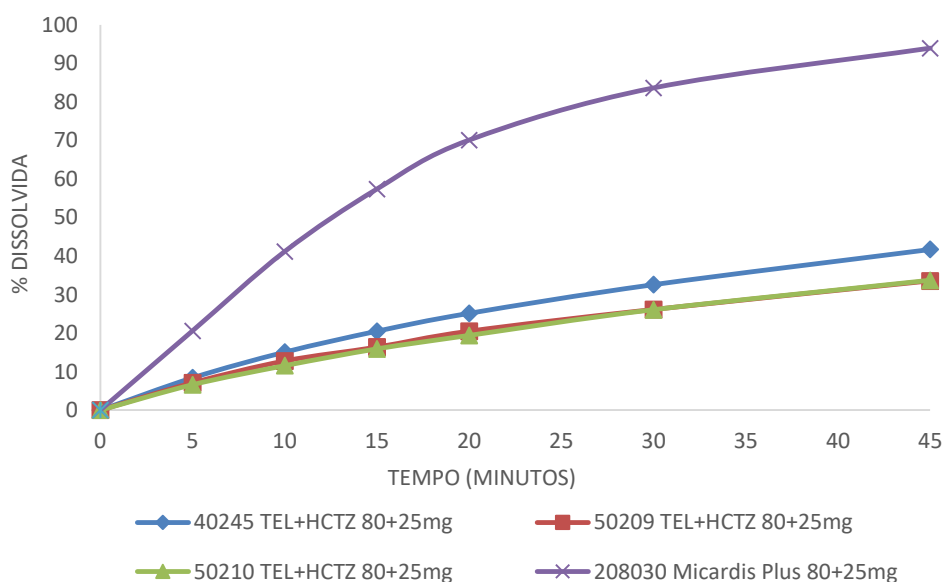


Figura 5.9 - Perfil de dissolução do telmisartan em HCl 0,1 N pH 1,2 para as formulações teste e para o produto de referência (Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.11 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/25 mg em HCl 0,1 N pH 1,2

Dosagem (80/25 mg TEL/HCTZ)	f_2	Similaridade
40245	19,94	Não
50209	17,39	Não
50210	17,18	Não

5.2.1.2 Formulação 80/12,5 mg TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução para o telmisartan da dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ em HCl 0,1 N pH 1,2 representados na Figura 5.10 apresentam valores de dissolução inferiores a 85% ao fim de 15 minutos para ambos os produtos (teste e referência). Analogamente à situação anterior, recorreu-se ao cálculo do fator de similaridade (f_2), e pela Tabela 5.13 é possível observar que, tal como na dosagem de 80/25 TEL/HCTZ mg, não há similaridade entre os lotes teste e o produto de referência. Mais uma vez, ambos os produtos (teste e referência) apresentaram dissoluções lentas ao fim de 15 minutos. No entanto, o produto de referência apresentou uma taxa de dissolução maior ao fim do tempo de ensaio quando comparado com os lotes teste.

Verifica-se ainda pela Tabela 5.12, valores de RSD elevados em vários tempos de ensaio dos lotes teste. Tal como na dosagem anterior, estes resultados não são devido a uma dispersão anormal dos resultados individuais dos comprimidos, mas sim ao facto do valor médio ser bastante baixo.

Tabela 5.12 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/12,5 mg em HCl 0,1 N pH 1,2

Tempo (minutos)	Lotes							
	50219		50220		50221		502430	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	5,93	10,69	7,34	21,09	7,56	28,89	17,29	8,68
10	10,74	10,20	11,17	9,83	11,40	22,39	36,22	6,36
15	14,73	7,01	14,96	13,51	14,60	21,32	51,03	6,04
20	18,08	9,29	18,27	11,93	17,60	20,94	61,56	5,42
30	24,28	8,36	24,61	12,51	22,81	20,64	76,32	6,72
45	31,46	7,83	31,74	9,21	28,76	19,52	89,35	5,53

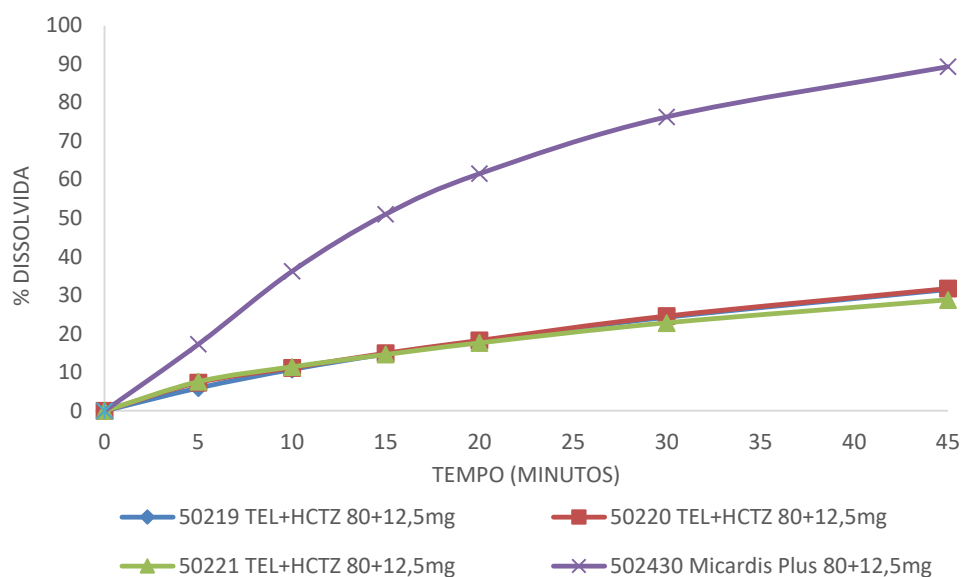


Figura 5.10 - Perfil de dissolução do telmisartan em HCl 0,1 N pH 1,2 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.13 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/12,5 mg em HCl pH 1,2

Dosagem (80/12.5 mg TEL/HCTZ)	f_2	Similaridade
50219	19,40	Não
50220	19,56	Não
50221	18,91	Não

5.2.1.3 Formulação 40/12,5 TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução para o telmisartan da dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ em HCl 0,1 N pH 1,2 estão representados na Figura 5.11. Pela Tabela 5.14, é possível ver que todos os lotes avaliados apresentam valores de dissolução inferiores a 85% ao fim de 15 minutos. Assim, analogamente às formulações anteriores, recorreu-se ao cálculo do fator de similaridade (f_2) e pela Tabela 5.15 é possível ver que, tal como nas outras duas dosagens, os lotes do produto teste não são semelhantes ao medicamento de referência. Quanto aos valores de RSD dos lotes teste, alguns pontos apresentam valores superiores a 10% pela mesma razão anteriormente mencionada. Analogamente às duas dosagens anteriores, ambos os produtos (teste e referência) apresentaram dissoluções lentas ao fim de 15 minutos, sendo que o produto de referência apresentou uma taxa de dissolução maior ao fim do tempo de ensaio quando comparado com os lotes teste.

Tabela 5.14 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 40/12,5 mg em HCl 0,1 N pH 1,2

Tempo (minutos)	Lotes							
	50216		50217		50218		544200	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	7,52	7,01	8,23	15,69	8,05	8,54	34,21	18,85
10	12,65	8,00	14,22	11,85	14,07	9,51	51,69	13,61
15	17,47	7,67	19,33	11,16	18,95	10,83	66,74	10,87
20	21,40	12,69	24,20	10,12	23,59	11,52	78,02	9,13
30	28,94	11,52	32,47	9,66	31,34	9,05	90,63	5,27
45	38,89	7,84	42,64	10,73	41,17	9,11	93,98	1,48

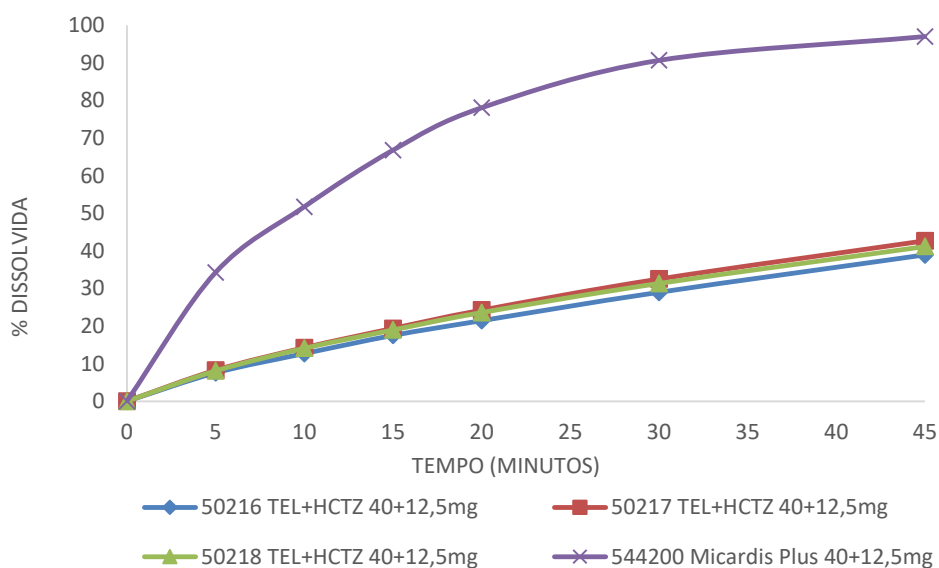


Figura 5.11 - Perfil de dissolução do telmisartan em HCl pH 1,2 na dosagem 40/12,5 TEL/HCTZ para as formulações teste e para o produto de referência (Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.15 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 40/12,5 mg em HCl pH 1,2

Dosagem (40/12,5 mg TEL/HCTZ)	f_2	Similaridade
50216	15,01	Não
50217	16,14	Não
50218	15,81	Não

5.2.2 Meio de Dissolução: tampão acetato (pH 4,5)

5.2.2.1 Formulação 80/25 mg TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução para o telmisartan da dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ em tampão acetato pH 4,5 estão representados na Figura 5.12. Como se pode ver pela Tabela 5.16, ambos os produtos (teste e referência) apresentam valores de dissolução inferiores a 85% ao fim de 15 minutos bem com uma dissolução incompleta ao fim do tempo de ensaio. Neste meio mantém-se a não similaridade dos produtos como pode ser verificado através dos resultados apresentados na Tabela 5.17. No entanto, é observada uma inversão de comportamento entre a quantidade dissolvida nos lotes do produto teste e no produto de referência. Contrariamente ao que acontece em pH 1,2, aqui, a percentagem dissolvida dos lotes teste é superior à percentagem dissolvida do medicamento de referência.

Tabela 5.16 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/25 mg em tampão acetato pH 4,5

Tempo (minutos)	Lotes							
	40245		50209		50210		208030	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	36,19	7,50	36,95	5,80	40,89	10,00	32,39	13,00
10	60,27	8,60	64,60	6,60	66,27	6,70	34,96	5,40
15	68,87	5,70	69,58	7,00	72,18	6,00	38,32	7,30
20	66,48	8,50	71,61	3,10	71,67	5,20	40,13	6,40
30	65,28	4,50	68,52	2,50	70,14	4,90	37,66	7,90
45	65,13	6,30	66,53	7,70	67,67	4,80	37,36	6,20

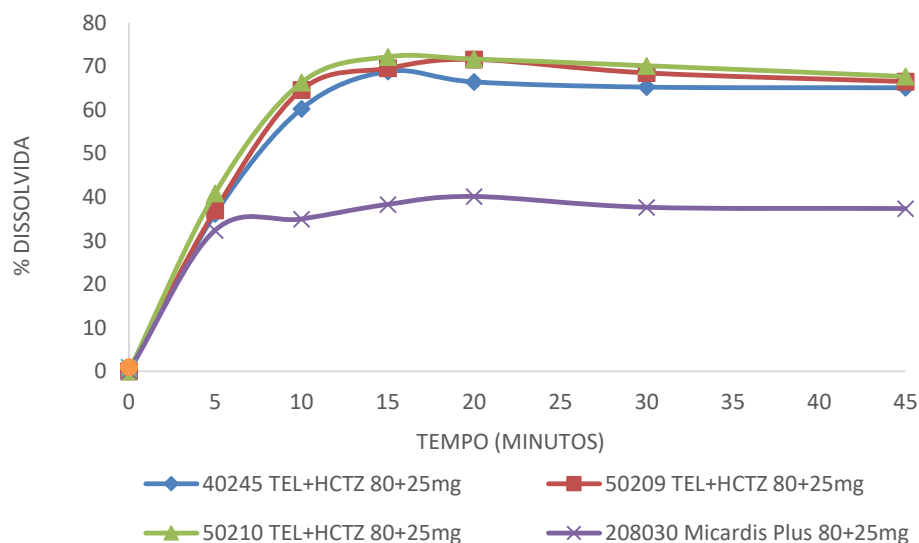


Figura 5.12 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão acetato pH 4,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.17 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/25 mg em tampão acetato pH 4,5

Dosagem (80/25 mg TEL/HCTZ)	f_2	Similaridade
40245	29,90	Não
50209	27,71	Não
50210	26,61	Não

5.2.2.2 Formulação 80/12,5 TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução para o telmisartan da dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ em tampão acetato pH 4,5 estão representados na Figura 5.13 e pela Tabela 5.18 é possível ver que ambos os produtos (teste e referência) apresentam valores de dissolução inferiores a 85% ao fim de 15 minutos. Desta forma, e tal como na formulação anterior, recorreu-se ao cálculo do fator de similaridade (f_2) e pela Tabela 5.19 é possível ver que, tal como na dosagem anterior, os lotes do produto teste não são semelhantes ao medicamento de referência.

Mais uma vez, ambos os produtos (teste e referência) apresentaram uma dissolução incompleta ao fim do tempo de ensaio.

Tabela 5.18 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/12,5 em tampão acetato pH 4,5

Tempo (minutos)	Lotes							
	50219		50220		50221		502430	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	33,73	7,36	36,32	8,82	36,92	7,45	28,88	5,52
10	57,74	6,25	59,51	6,50	60,41	6,31	30,85	6,67
15	66,80	4,62	66,71	6,04	69,75	3,94	31,08	6,03
20	65,6	3,59	66,83	5,36	67,19	7,13	30,68	9,19
30	64,55	5,07	64,91	4,21	68,85	3,22	28,90	6,96
45	64,68	4,10	63,96	5,62	65,84	2,39	29,90	12,04

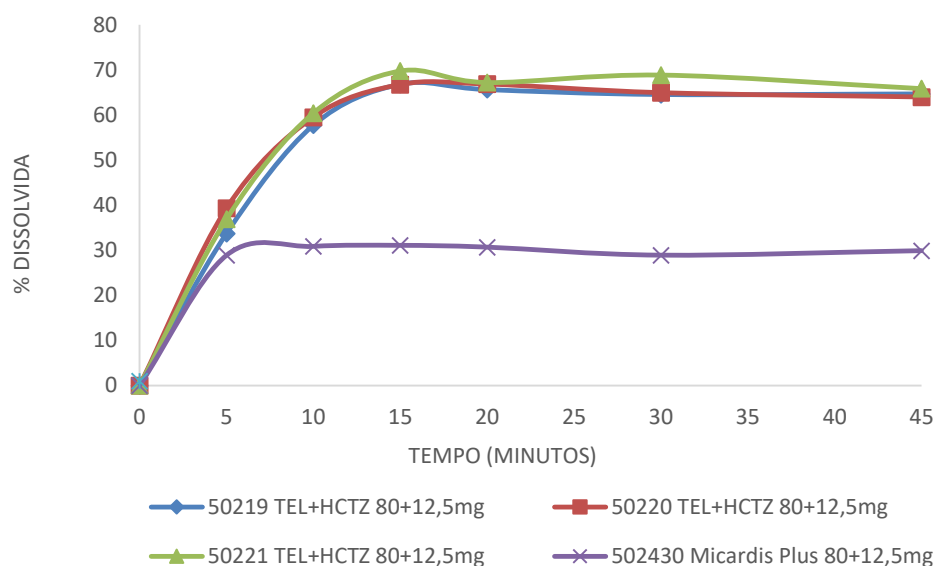


Figura 5.13 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão acetato pH 4,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.19 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/12,5 mg em tampão acetato pH 4,5

Dosagem (80/12.5 mg TEL/HCTZ)	f_2	Similaridade
50219	25,50	Não
50220	25,16	Não
50221	23,87	Não

5.2.2.3 Formulação 40/12,5 TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução para o telmisartan da dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ em tampão acetato pH 4,5 representados na Figura 5.14 apresentam valores de dissolução inferiores a 85% ao fim de 15 minutos para ambos os produtos (teste e referência), como pode ser verificado pela Tabela 5.20. Através do cálculo do fator de similaridade (f_2) e pela Tabela 5.21 é possível ver que, contrariamente às dosagens anteriores, os lotes do produto teste são semelhantes ao medicamento de referência. Esta semelhança é justificada devido ao aumento de percentagem dissolvida de telmisartan por parte da formulação do produto de referência uma vez que o medicamento teste manteve o mesmo comportamento que as dosagens anteriores. O aumento da percentagem dissolvida observado no medicamento de referência pode ser justificado pela menor massa total do comprimido, que vai originar uma menor saturação do meio, aumentando o seu poder de dissolução.

Tabela 5.20 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 40/12,5 mg em tampão acetato pH 4,5

Tempo (minutos)	Lotes							
	50216		50217		50218		544200	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	42,07	7,56	43,69	4,23	44,34	8,69	45,41	16,65
10	65,19	3,48	64,59	2,70	63,80	3,22	53,46	5,71
15	67,67	4,12	65,48	3,40	64,58	2,65	55,05	2,86
20	66,12	2,61	63,98	2,50	65,19	3,55	54,97	3,40
30	65,49	4,48	63,69	2,00	63,48	2,06	55,33	4,45
45	63,05	2,71	62,95	5,22	62,50	1,69	55,99	3,97

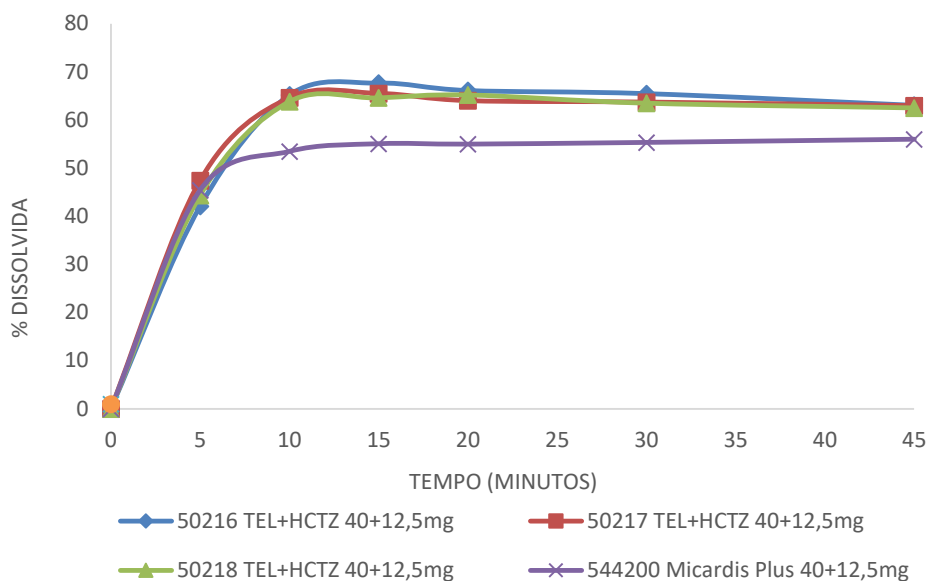


Figura 5.14 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão acetato pH 4,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.21 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 40/12,5 mg em tampão acetato pH 4,5

Dosagem (40/12,5 mg TEL/HCTZ)	f_2	Similaridade
50216	50,16	Sim
50217	53,35	Sim
50218	53,92	Sim

5.2.3 Meio de Dissolução: tampão fosfato (pH 6,8)

5.2.3.1 Formulação 80/25 TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução dos lotes do produto teste e do produto de referência para o telmisartan da dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ em tampão fosfato pH 6,8 estão representados na Figura 5.15. Pela Tabela 5.22, é possível perceber que os lotes do produto teste apresentam valores de dissolução superiores a 85% ao fim de 15 minutos. No entanto, estes resultados não isentam o cálculo do fator de similaridade f_2 uma vez que o mesmo não é verificado para o produto de referência.

Assim, recorreu-se ao cálculo do fator de similaridade (f_2). Os valores obtidos e apresentados na Tabela 5.23 foram 78,00, 53,44 e 73,03 para os lotes 40245, 50209 e 50210 respectivamente, o que indica que os produtos são semelhantes em tampão fosfato pH 6,8 uma vez que o valor de f_2 se encontra no intervalo entre 50-100.

Tabela 5.22 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/25 em tampão fosfato pH 6,8

Tempo (minutos)	Lotes							
	40245		50209		50210		208030	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	44,41	6,00	45,06	7,50	45,53	8,60	44,01	5,00
10	75,37	3,40	75,78	5,30	75,07	5,80	75,18	5,20
15	86,34	6,00	89,15	3,40	86,06	6,70	80,94	6,40
20	83,17	9,00	90,00	2,20	86,56	6,80	81,46	5,10
30	78,62	9,40	90,89	5,50	76,82	17,10	77,76	4,00
45	71,33	14,40	90,07	6,20	82,51	15,00	79,25	4,20

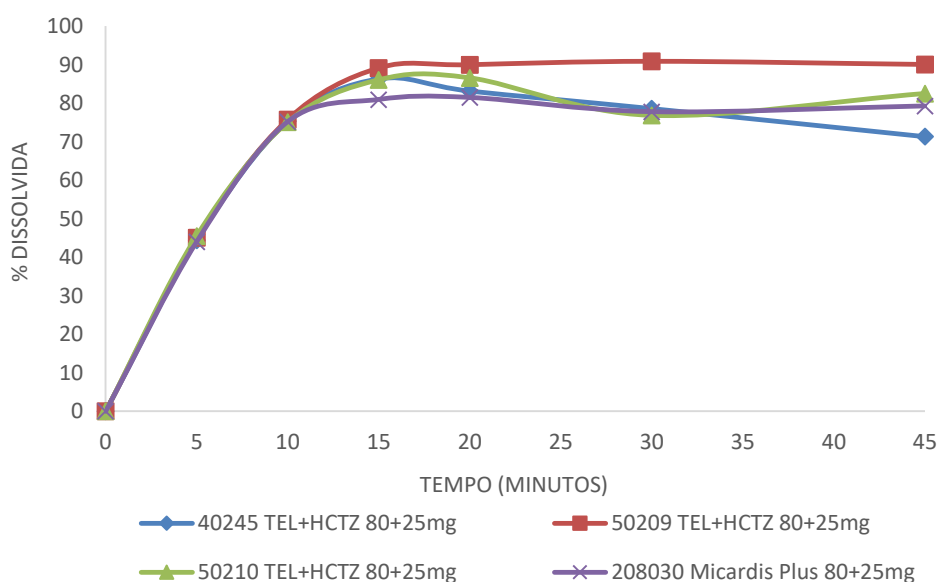


Figura 5.15 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 6,8 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ)

Tabela 5.23 - Similaridade entre os perfis de dissolução dos diferentes lotes do medicamento teste e do produto de referência para a dosagem 80/25 mg em tampão fosfato pH 6,8

Dosagem (80/ 25 mg TEL/HCTZ)	f_2	Similaridade
40245	78,00	Sim
50209	53,44	Sim
50210	73,03	Sim

5.2.3.2 Formulação 80/12,5 mg TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução dos lotes do produto teste e do produto de referência para o telmisartan da dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ em tampão fosfato pH 6,8 estão representados na Figura 5.16. Pela Tabela 5.24, é possível ver que os lotes teste 50219 e 50220 e o lote do produto de referência, apresentam valores de dissolução superiores a 85% ao fim de 15 minutos. Deste modo, os dois lotes teste enunciados são considerados semelhantes ao produto de referência sem serem necessários mais cálculos. Contudo, o lote 50221 apresentou uma percentagem dissolvida inferior a 85% ao fim de 15 minutos sendo necessário recorrer ao cálculo do fator de similaridade, f_2 . O valor obtido foi 60,32% tendo-se verificado também a semelhança entre este lote e o produto de referência, uma vez que 60,32% se encontra no intervalo entre 50 e 100.

Tabela 5.24 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/12,5 mg em tampão fosfato pH 6,8

Tempo (minutos)	Lotes							
	5019		50220		50221		502430	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	41,49	4,80	45,08	7,60	44,32	8,84	51,17	9,73
10	72,86	4,54	76,60	5,31	73,39	4,99	81,32	5,95
15	88,84	2,87	88,13	2,46	82,89	5,26	88,32	3,30
20	91,07	1,85	87,96	5,37	83,06	4,82	88,25	3,44
30	90,37	3,99	89,39	1,84	83,33	5,17	88,02	3,98
45	86,33	5,23	88,75	2,59	80,28	9,55	84,81	6,69

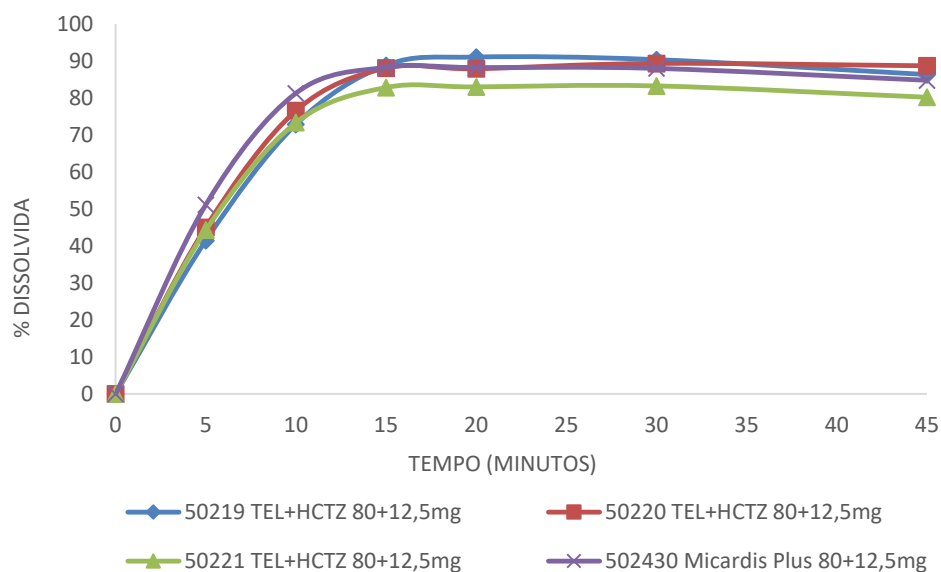


Figura 5.16 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 6,8 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ)

5.2.3.3 Formulação 40/12,5 TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução dos lotes do produto teste e do produto de referência para o telmisartan da dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ em tampão fosfato pH 6,8 estão representados Figura 5.17. Pela Tabela 5.25, é possível ver que ambos os produtos (teste e referência), apresentam valores de dissolução superiores a 85% ao fim de 15 minutos. Assim, os lotes teste são considerados semelhantes ao produto de referência sem serem necessários mais cálculos.

Tabela 5.25 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 40/12,5 mg em tampão fosfato pH 6,8

Tempo (minutos)	Lotes							
	50216		50217		50218		544200	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	51,52	9,70	49,79	8,80	48,68	10,69	55,46	16,48
10	84,34	4,59	79,79	3,51	77,92	7,02	81,27	5,83
15	87,79	3,26	86,96	2,52	85,53	4,05	86,06	1,71
20	89,19	1,78	87,05	2,65	87,53	2,23	87,49	4,47
30	89,35	1,33	85,85	1,99	86,40	2,71	87,30	2,78
45	88,20	1,98	87,01	2,48	88,63	2,49	85,58	3,42

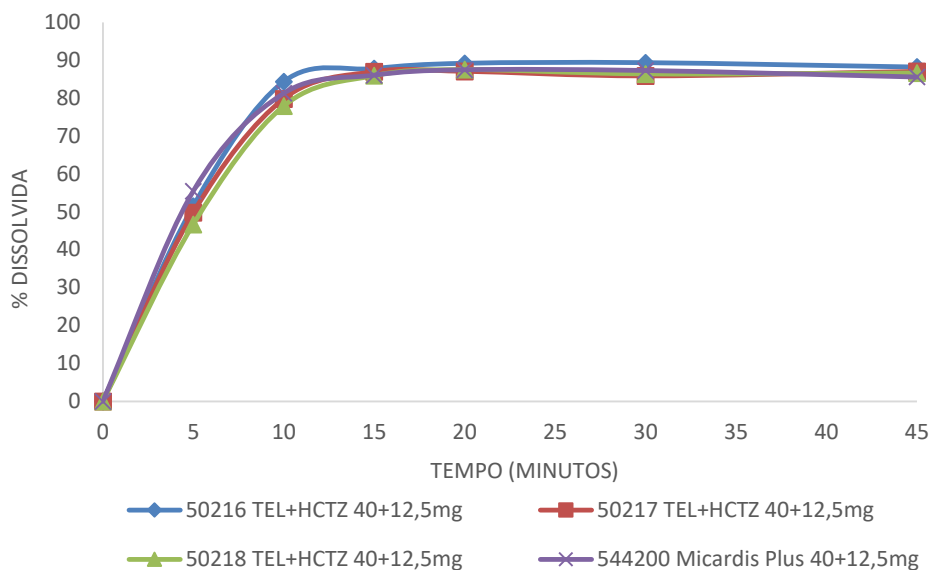


Figura 5.17 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 6,8 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ)

5.2.4 Meio de Dissolução: tampão fosfato (pH 7,5)

5.2.4.1 Formulação 80/25 mg TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução dos lotes do produto teste e do produto de referência para o telmisartan da dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ em tampão fosfato pH 7,5 (meio ideal de dissolução para o TEL) estão representados Figura 5.18. Pela Tabela 5.26, é possível ver que ambos os produtos (teste e referência), apresentam valores de dissolução superiores a 85% ao fim de 15 minutos. Deste modo, os lotes teste são considerados semelhantes ao produto de referência sem serem necessários mais cálculos.

Tabela 5.26 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/25 mg em tampão fosfato pH 7,5

Tempo (minutos)	Lotes							
	40245		50209		50210		208030	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	53,75	20,20	50,54	11,80	45,12	8,30	52,54	6,20
10	82,03	9,30	81,89	6,20	79,33	8,60	84,87	4,00
15	91,77	3,70	92,49	4,60	88,22	4,70	92,68	2,00
20	93,32	3,20	94,21	1,30	93,44	4,40	94,63	2,50
30	91,70	6,10	94,82	3,40	92,64	2,40	95,56	1,70
45	95,05	2,60	96,24	2,10	94,84	2,10	94,16	1,90

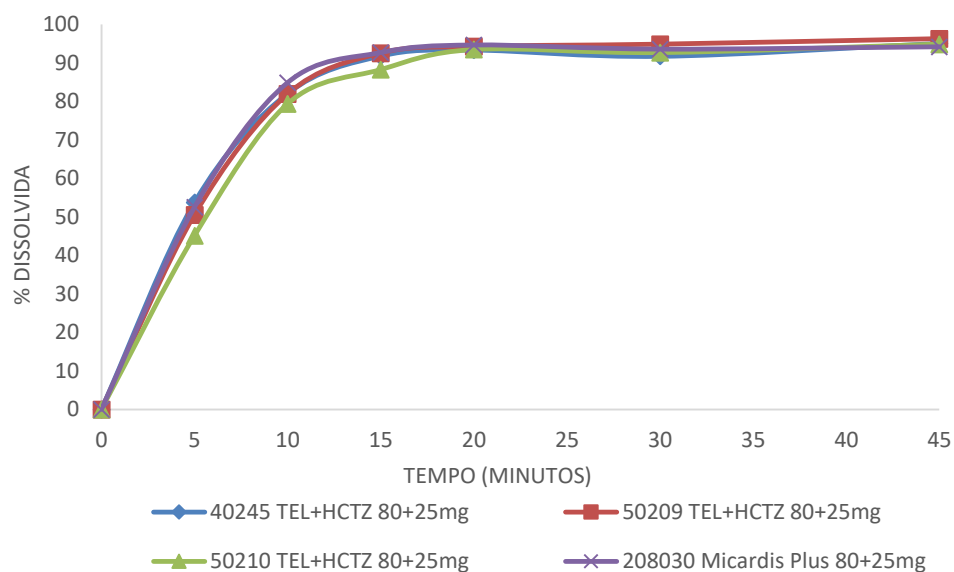


Figura 5.18 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 7,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/25 mg TEL/HCTZ)

5.2.4.2 Formulação 80/12,5 mg TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução dos lotes do produto teste e do produto de referência para o telmisartan da dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ em tampão fosfato pH 7,5 (meio ideal de dissolução para o TEL) estão representados Figura 5.19. Pela Tabela 5.27 e analogamente à formulação anterior, é possível ver que todos os lotes apresentaram valores de dissolução superiores a 85% ao fim de 15 minutos. Assim, os lotes teste são considerados semelhantes ao produto de referência sem serem necessários mais cálculos.

Tabela 5.27 - Valores médios de percentagem dissolvida de telmisartan na dosagem 80/12,5 em tampão fosfato pH 7,5

Tempo (minutos)	Lotes							
	5019		50220		50221		502430	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	44,73	6,20	46,27	6,70	48,10	8,40	51,67	8,34
10	74,11	3,20	76,88	5,40	78,59	7,50	81,89	4,35
15	89,85	1,00	90,10	1,90	90,59	2,90	91,32	1,86
20	92,22	2,60	93,13	0,80	91,80	1,00	92,04	2,20
30	92,23	1,00	93,18	0,80	92,92	0,60	91,58	2,55
45	92,68	1,30	93,87	0,90	92,66	1,70	91,26	2,12

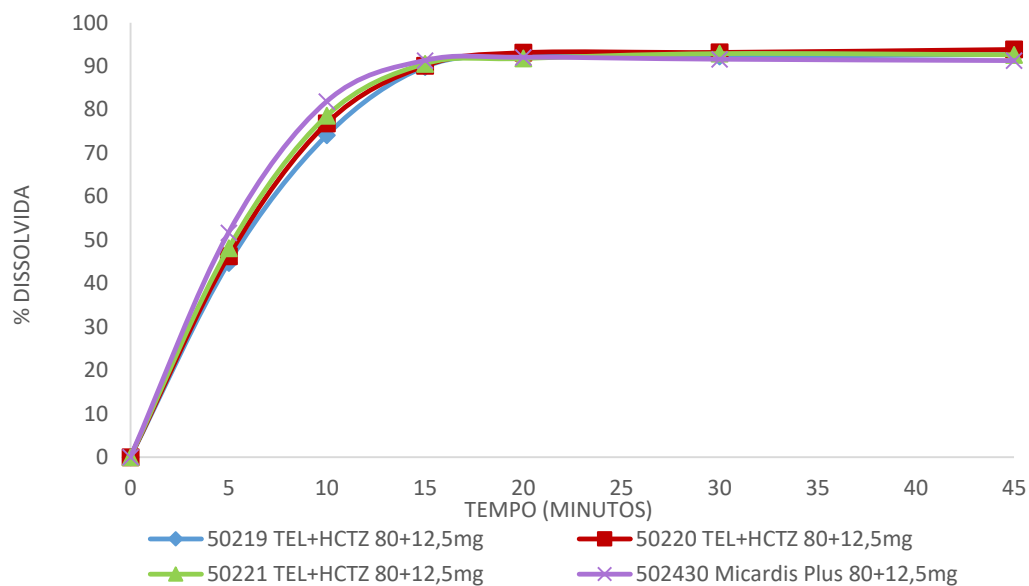


Figura 5.19 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 7,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ)

5.2.4.3 Formulação 40/12,5 mg TEL/HCTZ

Os perfis de dissolução dos lotes do produto teste e do produto de referência para o telmisartan da dosagem 80/12,5 mg TEL/HCTZ em tampão fosfato pH 7,5 (meio ideal de dissolução para o TEL) estão representados na Figura 5.20. À semelhança das restantes dosagens também aqui todos os lotes apresentaram valores de dissolução superiores a 85% ao fim de 15 minutos (Tabela 5.28). Assim, os lotes teste são considerados semelhantes ao produto de referência sem serem necessários mais cálculos.

Tabela 5.28 - Valores médios de percentagem dissolvida do telmisartan na dosagem 40/12,5 em tampão fosfato pH 7,5

Tempo (minutos)	Lotes							
	50216		50217		50218		544200	
	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)	Média (%)	RSD (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	56,12	10,06	54,41	6,97	58,03	9,31	60,87	14,06
10	87,15	4,48	87,68	4,32	88,47	3,94	87,25	4,79
15	93,72	1,27	94,82	1,06	93,10	2,22	91,17	3,41
20	93,79	1,74	95,98	0,97	92,36	1,47	90,45	3,80
30	94,47	1,62	94,75	0,80	93,23	1,32	89,95	2,88
45	94,19	1,82	96,35	0,59	92,92	1,72	89,68	3,71

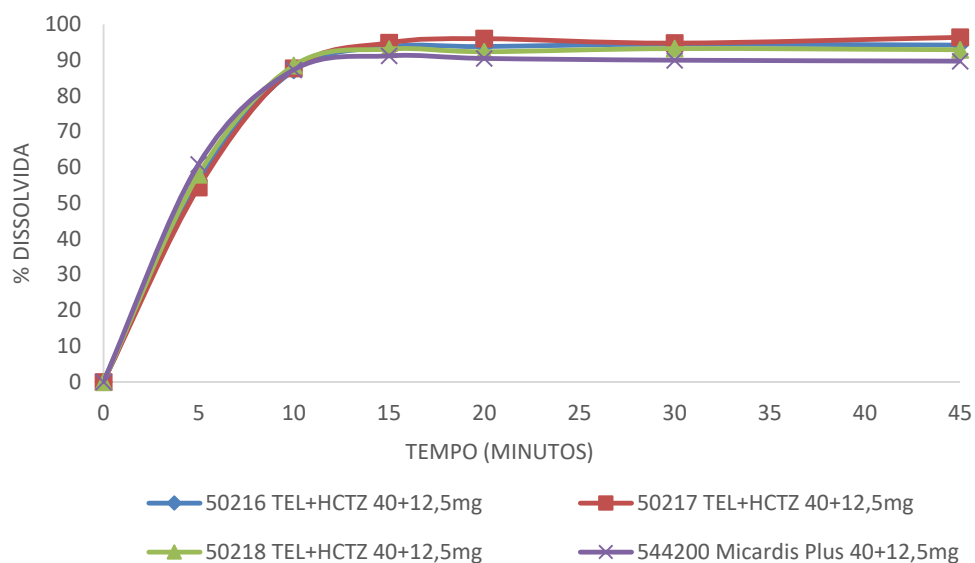


Figura 5.20 - Perfil de dissolução do telmisartan em tampão fosfato pH 7,5 para as formulações teste e para o produto referência (Dosagem 40/12,5 mg TEL/HCTZ)

Avaliando de forma global os gráficos referentes aos perfis de dissolução dos 3 lotes teste de cada dosagem e em cada meio, observa-se que, na generalidade, em cada condição, os 3 lotes apresentam um comportamento idêntico indicando consistência e homogeneidade entre os lotes. Avaliando ainda de uma forma geral os resultados obtidos e uma vez que em alguns casos foram observadas diferenças nas taxas de dissolução entre os lotes teste e o medicamento de referência torna-se importante perceber quais as causas que podem ter levado às diferenças observadas.

Segundo a literatura, há vários fatores que podem levar a estas diferenças, nomeadamente: a origem do API, o processo de fabrico utilizado, o formato do comprimido, o tipo de excipientes utilizados, entre outros [85].

Como anteriormente referido no capítulo 3.6, o telmisartan é pouco solúvel e altamente permeável pelo que pertence à classe II do sistema BCS. Estudos realizados por vários autores, reportam que o telmisartan puro será solúvel não só em meios fortemente básicos mas também em meios fortemente ácidos sendo praticamente insolúvel em pH's intermédios (3-9) [86,87,61].

Devido à baixa solubilidade da molécula em condições intermédias, foi necessário, durante o desenvolvimento da formulação, utilizar estratégias de forma a aumentar a solubilidade da molécula. Assim, o aumento da solubilidade na formulação teste foi tentado recorrendo ao uso dos agentes alcalinos NaOH e meglumina com o objetivo de se formar um sal solúvel em toda a gama do pH [88].

Além disso, foi ainda utilizado lauril sulfato de sódio como coadjuvante, para melhorar a solubilidade do fármaco.

Começando por analisar os dados referentes ao meio de dissolução HCl 0,1 N pH 1,2, é possível perceber que o medicamento de referência apresentou uma percentagem dissolvida superior ao

medicamento teste ao fim do tempo de ensaio. Devido às características químicas da molécula e como observado na formulação de referência, é esperado que o telmisartan apresente elevadas taxas de dissolução neste meio, devido à alta solubilidade da molécula em pH 1,2 [88]. Contudo, nos lotes teste para o mesmo meio de dissolução, a percentagem dissolvida de substância ativa é bastante inferior à observada no medicamento de referência, o que sugere que a causa destas diferenças possam ser as diferenças na formulação.

Na formulação teste, para além dos excipientes comuns à formulação do medicamento referência, foi utilizado lauril sulfato de sódio com o objetivo de aumentar a solubilidade do telmisartan em todos os pH's avaliados sendo provavelmente esta a causa da diferença dos resultados obtidos. Após uma investigação efetuada pode-se concluir que, em pH 1,2, o lauril sulfato de sódio reage com o telmisartan levando à formação de um precipitado insolúvel, o que resulta numa diminuição da taxa de libertação do fármaco.

No meio de dissolução tampão acetato pH 4,5, a dissolução limitada do telmisartan no medicamento de referência é justificada pela solubilidade limitada da molécula neste pH [89]. No que diz respeito aos lotes do medicamento teste, o mesmo não se verifica, sendo as percentagens de substância ativa dissolvidas superiores a 60% devido à utilização de lauril sulfato de sódio na formulação teste, que é responsável pelo aumento da solubilidade do telmisartan neste meio. Além disso, segundo Lichanda, Luo, Wang, Pei e Zhang, um outro fator que pode justificar as diferenças observadas nas taxas de dissolução de medicamentos que contenham a(s) mesma(s) substância(s) ativa(s) é o uso de desagregantes (sendo que esta categoria de excipientes apenas foi utilizada na formulação teste), que pode afetar a taxa de desagregação do fármaco e consequentemente a sua taxa de dissolução [90].

Também Pandya e Chaudhari, numa tentativa de otimizar uma formulação que continha telmisartan, mostraram que os excipientes vão ter uma função fulcral na solubilidade da molécula, sustentando mais uma vez a ideia que a causa das diferenças observadas entre o medicamento teste e o medicamento de referência pode estar intimamente ligada aos excipientes usados em cada uma delas [91].

No caso do meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8, todos os lotes estudados (teste e referência) apresentaram taxas de dissolução semelhantes. Apesar de, como foi dito anteriormente, o telmisartan puro apresentar uma baixa solubilidade neste meio, através da reação do telmisartan com a meglumina em meio fortemente alcalino devido à presença de hidróxido de sódio, foi possível inverter este comportamento do telmisartan e conseguir um aumento da sua solubilidade devido à sua transformação num sal solúvel nesta gama de pH, tal como é sustentado pelo estudo realizado por Tran e Lee onde os autores demonstraram que quando incorporados na formulação, estes agentes (meglumina e NaOH), permitem melhorar significativamente a taxa de dissolução da molécula em pH 6,8 [87].

Por fim, no tampão fosfato pH 7,5, meio descrito como ótimo para a dissolução da molécula pela monografia da USP, é possível ver que todos os lotes avaliados apresentam uma percentagem dissolvida superior a 85% após 15 minutos demonstrando um comportamento semelhante de

ambos os produtos. No estudo realizado por Pandya e Chaudhari já anteriormente mencionado, os autores também recorreram ao uso de meglumina e hidróxido de sódio de forma a melhorar a taxa de dissolução do telmisartan em pH 7,5, o que sustenta a ideia de que estes componentes melhoram significativamente a taxa de dissolução do telmisartan neste meio [91].

Em suma, verifica-se que existe um perfil de dissolução *in vitro* diferente entre o medicamento teste e o medicamento de referência nos pH's 1,2 e 4,5, e que tal diferença pode ser função do uso de lauril sulfato de sódio na formulação teste. Esta diferença de dissolução do fármaco nos referidos pH's pode representar um fator limitante na velocidade de absorção do fármaco *in vivo*, influenciando de forma significativa a biodisponibilidade do telmisartan no produto teste tornando-o não bioequivalente ao produto de referência.

6. CONCLUSÕES

Concluindo, face aos resultados obtidos na validação do método analítico, verificou-se que:

- O método é específico, uma vez que não existem quaisquer picos interferentes no tempo de retenção do telmisartan;
- A linearidade foi verificada entre as concentrações 8,91 µg/ml e 53,49 µg/ml, ou seja, dos 20% aos 120% da concentração de trabalho;
- Em termos de repetibilidade do equipamento, a metodologia encontra-se validada uma vez que o RSD foi inferior 2%;
- Na avaliação da repetibilidade do método, o RSD foi inferior a 3%, cumprindo o critério de aceitação definido;
- Em termos de precisão intermédia a metodologia encontra-se validada uma vez que ao variar o equipamento, o dia e o analista, o desvio padrão relativo para cada analista foi inferior a 2% e para inter-analistas inferior a 3%;
- Para a avaliação da exatidão do método, recorreu-se à realização dos ensaios de recuperação para diferentes níveis de concentração. Uma vez que a percentagem de recuperação para cada nível de concentração se encontra dentro dos limites 95%-105%, a metodologia encontra-se validada também para este parâmetro;
- No ensaio de estabilidade, verifica-se que ambas as soluções (amostra e padrão) são estáveis quer à temperatura ambiente quer quando armazenadas no frigorífico uma vez que, após 72h, apresentam diferenças inferiores a 3% do valor inicial, cumprindo o critério de aceitação definido.

Após o cumprimento de todos os requisitos de cada etapa da validação, o método considera-se validado.

Relativamente aos estudos de dissolução *in vitro*, já foi visto no capítulo 3.3 que para fármacos com uma baixa solubilidade aquosa pertencentes à classe II do sistema BCS, a dissolução é o passo determinante da absorção do mesmo no trato gastrointestinal, e consequentemente este fenómeno irá exercer um forte efeito na biodisponibilidade do fármaco. Isso sugere que as diferenças observadas nas taxas de dissolução da formulação teste em relação à formulação de referência em pH 1,2 e pH 4,5 podem levar a que sejam observadas diferenças na biodisponibilidade do produto teste em relação ao produto referência em estudos *in vivo*.

Sendo o principal objetivo de um estudo de bioequivalência demonstrar a intercambialidade dos produtos através da comparação da velocidade de absorção^[92] e sabendo que o perfil de dissolução é um parâmetro indicativo do comportamento *in vivo*, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o produto teste poderá ser bioequivalente ao produto de referência Micardis Plus®, pelo que a realização do estudo *in vivo* não é aconselhada com a atual formulação. No entanto, apesar do comportamento do fármaco *in vitro* não ser sempre semelhante ao medicamento de referência, os dois produtos até poderão ser considerados

bioequivalentes no estudo *in vivo*, uma vez que existem alguns fatores, como a alimentação e a presença de enzimas, que podem influenciar o comportamento dos produtos no corpo humano e a velocidade com que o fármaco será absorvido, podendo fazer com que dois produtos não semelhantes *in vitro* sejam na realidade semelhantes *in vivo* [86].

Assim, podem ser adotadas duas estratégias no futuro:

- Fazer alterações na formulação em estudo com o intuito de obter um comportamento *in vitro* semelhante ao produto de referência em todos os meios de dissolução de forma a maximizar as hipóteses de sucesso no estudo de bioequivalência;
- Efetuar um estudo piloto *in vivo* com o lote 40245 (uma vez que é o que apresenta valores de f_2 mais próximos de 100 em todos os meios estudados) num número reduzido pessoas para avaliar se o desempenho *in vivo* do fármaco é semelhante ao do medicamento de referência apesar das diferenças observadas *in vitro*.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Chereson, "Bioavailability, Bioequivalence, and Drug Selection," pp. 1–117, 1996.
- [2] J. Morais, "Os medicamentos genéricos e a nova norma de orientação de bioequivalência," 2009.
- [3] EMA, "Questions and answers on generic medicines," *Quest. answers generic Med.*, vol. 44, no. November, pp. 2–4, 2012.
- [4] E. Costa, "Avaliação da Biodisponibilidade e Bioequivalência: Aspectos Críticos," 2004.
- [5] "Avaliação Biodisponibilidade/Bioequivalência." [Online]. Available: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMAN/O/AVALIACAO_TECNICO_CIENTIFICA/AVALIACAO_DISPONIBILIDADE_EQUIVALENCIA. [Accessed: 20-Aug-2016].
- [6] S. Cascone, F. Santis, G. Lamberti, and G. Titomanlio, "The influence of dissolution conditions on the drug ADME phenomena," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 79, no. 2, pp. 382–391, 2011.
- [7] USP, "Telmisartan and Hydrochlorothiazide Tablets," pp. 1–3, 2015.
- [8] "História - Grupo Azevedos - Grupo Azevedos." [Online]. Available: http://www.grupoazevedos.com/grupo_azevedos/historia. [Accessed: 05-Sep-2016].
- [9] Sofarimex, "Manual de Gestão," pp. 1–28, 2012.
- [10] L. Pisco, "Os Medicamentos Genéricos nos Cuidados de Saúde Primários," pp. 1–2, 2009.
- [11] R. Alves and F. Ramos, "Medicamentos Genéricos e Sustentabilidade do SNS," pp. 243–254, 2011.
- [12] Infarmed, "Simpósio 'Medicamentos Genéricos,'" pp. 1–4, 2007.
- [13] P. Barros, "Vantagem económica dos genéricos," pp. 1–5, 2009.
- [14] G. Prachi, S. Darshil, and M. Dilip, "Comparative Study Of Reference Product In Generic Drug Development In U.S And Europe," vol. 6, pp. 3113–3119, 2015.
- [15] S. Dunne, B. Shannon, C. Dunne, and W. Cullen, "A review of the differences and similarities between generic drugs and their originator counterparts, including economic benefits associated with usage of generic medicines, using Ireland as a case study," pp. 1–19, 2013.
- [16] EMA, "Guideline On The Investigation Of Bioequivalence," vol. 1, no. January, pp. 1–27, 2010.
- [17] R. Lionberger, "FDA Critical Path Initiatives: Opportunities for Generic Drug Development," vol. 10, no. 1, 2008.
- [18] Infarmed, "Estados-membros de Referência," pp. 1–8, 2011.
- [19] EMA, "The Investigation Of Bioavailability And Bioequivalence," pp. 1–19, 2001.
- [20] M. Maillard and M. Burnier, "Is the fixed-dose combination of telmisartan and hydrochlorothiazide a good approach to treat hypertension?," vol. 3, no. 3, pp. 265–278, 2007.
- [21] EMA, "Micardis Plus - Telmisartan/Hidroclorotiazida," pp. 1–3, 2015.

- [22] M. Himaja, D. Poppy, and K. Asif, "Bilayer Tablet: A Novel Approach For Immediate Release Of Telmisartan And Hydrochlorothiazide Combination," vol. 2, no. 4, pp. 1079–1086, 2011.
- [23] R. Pereira, "Telmisartan: Quality Control , Purity and Solid State Telmisartan," pp. 557–566, 2014.
- [24] Infomed, "Autorização Telmisartan em Portugal." [Online]. Available: http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=9714&dc=&nome_comer=bWljYXJkaXMg&dosagem=&cnpem=&chnm=&forma_farmac=&atc=&disp=&estado_aim=&pesquisa_titular=&cft=&grupo_produto=&pagina=1. [Accessed: 25-Jul-2016].
- [25] F. Alatas, H. Ratih, and S. Soewandhi, "Enhancement of solubility and dissolution rate of telmisartan by telmisartan-oxalic acid co-crystal formation," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 7, no. 3, pp. 423–426, 2015.
- [26] W. Wienen, M. Entzeroth, J. Meel, J. Stangier, U. Busch, T. Ebner, J. Schmid, H. Lehmann, K. Matzek, J. Kempthorne-Rawson, V. Gladigau, and N. Hauel, "A Review on Telmisartan : A Novel , Long-Acting Angiotensin II-Receptor Antagonist," vol. 18, no. 2, pp. 127–154, 2000.
- [27] A. Battershill and L. Scott, "Telmisartan: A Review of its Use in the Management of Hypertension," vol. 66, no. 1, pp. 51–83, 2006.
- [28] A. Dokoumetzidis and P. Macheras, "A century of dissolution research : From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System," vol. 321, pp. 1–11, 2006.
- [29] P. Sinko, *Martin's Physical Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 2011.
- [30] S. Dash, P. Murthy, L. Nath, and P. Chowdhury, "Review Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems," vol. 67, no. 3, pp. 217–223, 2010.
- [31] A. Technologies, "Dissolution Theory, Methodology And Testing," 2007, pp. 1–66.
- [32] Z. Deliang and Y. Qiu, "Dissolution and In Vitro-In Vivo Correlation," no. 250, pp. 57–70, 2010.
- [33] S. Ghayas, M. Sheraz, and F. Anjum, "Factors Influencing the Dissolution Testing of Drugs," pp. 1–11, 2013.
- [34] E. Bamigbola, "Correlation of in vitro Dissolution Profiles with in vivo Pharmacokinetic Parameters of Some Commercial Brands of Aspirin Tablets Marketed in Nigeria," pp. 252–266.
- [35] S. Azarmi, W. Roa, and L. Raimar, "Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms," vol. 328, pp. 12–21, 2007.
- [36] M. Siewert, J. Dressman, C. Brown, V. Shah, J. Robinson, V. Shah, R. Uppoor, and R. Williams, "FIP/AAPS Guidelines for Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms*," pp. 1–6, 2003.
- [37] F. Brito, "Farmacocinética: Absorção, Biodisponibilidade e Bioequivalência," pp. 1–21, 2010.
- [38] C. Brown, H. Chokshi, B. Nickerson, R. Reed, B. Rohrs, and P. Shah, "Acceptable Analytical Practices for Soluble Compounds," pp. 56–65, 2004.

- [39] S. Qureshi, "Developing Discriminatory Drug Dissolution Tests and Profiles: Some Thoughts for Consideration on the Concept and Its Interpretation," pp. 18–23, 2006.
- [40] V. Uppoor, "Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/in vivo (bioavailability) correlations," *J. Control. Release*, vol. 72, pp. 127–132, 2001.
- [41] O. Anand, L. Yu, D. Conner, and B. Davit, "Dissolution Testing for Generic Drugs : An FDA Perspective," vol. 13, no. 3, pp. 328–335, 2011.
- [42] M. Swartz and M. Emanuele, "Developing and Validating Dissolution Procedures for Improved Product Quality," pp. 1–12, 2009.
- [43] M. Lobo and P. Costa, "Modeling and comparison of dissolution profiles," vol. 13, pp. 123–133, 2001.
- [44] T. Hara, A. Dunne, J. Butler, J. Devane, J. Butler, and J. Devane, "A review of methods used to compare dissolution profile data," vol. 1, no. 5, pp. 215–223, 1998.
- [45] FDA, "Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms," pp. 1–11, 1997.
- [46] T. Brief, "In Vitro Dissolution Testing for Solid Oral Dosage Forms," vol. 5, 2010.
- [47] Council of Europe, "Dissolution test for solid dosage forms," *Eur. pharmacopoeia 8.0*, pp. 228–230, 2013.
- [48] R. Manadas, M. Pina, and F. Veiga, "A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 38, no. 4, pp. 375–399, 2002.
- [49] J. Alsenz and M. Kansy, "High throughput solubility measurement in drug discovery and development ☆," vol. 59, pp. 546–567, 2007.
- [50] B. Faller and P. Ertl, "Computational approaches to determine drug solubility ☆," vol. 59, pp. 533–545, 2007.
- [51] D. Horter and J. Dressman, "Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract," vol. 46, pp. 75–87, 2001.
- [52] T. Peck, S. Hill, and M. Williams, "Drug passage across the cell membrane," *Pharmacol. Anaesth. Intensive Care*, third Ed., pp. 1–10, 2008.
- [53] M. Martinez and G. Amidon, "A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals," pp. 620–643, 2002.
- [54] S. Storpirtis, R. Marcolongo, F. Gasparotto, and C. Vilanova, "A Equivalência Farmacêutica no Contexto da Intercambialidade Entre Medicamentos Genéricos e de Referência: Bases Técnicas e Científicas," pp. 51–56, 2004.
- [55] USP, "Excipients," pp. 1–11, 2007.
- [56] K. Jackson, D. Young, and S. Pant, "Drug – excipient interactions and their affect on absorption is then absorbed by passive diffusion into the," *Pstt*, vol. 3, no. 10, pp. 336–345, 2000.
- [57] B. Sekhon, "Surfactants: Pharmaceutical and Medicinal Aspects," *J. Pharm. Technol. Res. Manag.*, vol. 1, pp. 11–36, 2013.
- [58] A. Kumar, T. Murthy, and A. Rani, "A Concise Review On Oral pH Independent Controlled

- Drug System,” vol. 3, no. 11, pp. 311–324, 2014.
- [59] A. Jain, Y. Ran, and S. Yalkowsky, “Effect of pH-sodium lauryl sulfate combination on solubilization of PG-300995 (an anti-HIV agent): a technical note.,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 5, no. 3, pp. 1–3, 2004.
 - [60] C. Taniguchi, Y. Kawabata, K. Wada, S. Yamada, and S. Onoue, “Microenvironmental pH-modification to improve dissolution behavior and oral absorption for drugs with pH-dependent solubility.,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 11, no. 4, pp. 505–16, 2014.
 - [61] M. Sangwai and P. Vavia, “Amorphous ternary cyclodextrin nanocomposites of telmisartan for oral drug delivery: Improved solubility and reduced pharmacokinetic variability,” *Int. J. Pharm.*, vol. 453, no. 2, pp. 423–432, 2013.
 - [62] R. Rowe, P. Sheskey, and M. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 2009.
 - [63] B. Ingelheim, “Folheto Informativo Micardis Plus 80/25 mg.”
 - [64] S. Qureshi, “Drug Dissolution Testing: Selecting a Dissolution Medium for Solid Oral Products,” pp. 1–4, 2013.
 - [65] A. Avdeef, “Physicochemical profiling (Solubility, Permeability and Charge State),” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 1, no. 4, pp. 277–351, 2001.
 - [66] M. Sharma and S. Neeraj, “Dissolution Specifications, Dissolution Profiling And Dissolution Profiles Comparison Methods,” *Int. J. Drug Res. Technol.*, vol. 2, pp. 297–305, 2012.
 - [67] A. Technologies, “Dissolution Reference Guide,” 2010.
 - [68] T. Schauble, “A Comparison of Various Sampling Methods for Tablet Release Tests Using the Stirrer Methods (USP Apparatus 1&2),” pp. 11–14, 1996.
 - [69] J. Emami, “In vitro-In vivo correlation: From Theory to Applications,” *J. Pharm. Pharm. Sci. a Publ. Can. Soc. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 169–89, 2006.
 - [70] J. Dressman and C. Reppas, “In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. SUPPL. 2, pp. 73–80, 2000.
 - [71] M. Kurdi and R. Karam, “Biowaivers: Criteria And Requirements,” pp. 1–11, 2015.
 - [72] G. Amidon, H. Lennernas, V. Shah, and J. Crison, “A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: Product Dissolution and in Vivo Bioavailability,” *Pharm. Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 413–420, 1995.
 - [73] F. Israr, Z. Mahmood, F. Hassan, S. Hasan, S. Jabeen, S. Naz, and L. Bashir, “Formulation design and evaluation of Cefuroxime axetil 125 mg immediate release tablets using different concentration of sodium lauryl sulphate as solubility enhancer,” *Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 50, no. 4, pp. 943–954, 2014.
 - [74] S. Hardikar, A. Bhosale, and R. Budhawant, “Establishment of in vivo-in vitro Correlation: a Cogent Strategy in Product Development Process,” *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 48, no. 4, pp. 66–73, 2014.
 - [75] S. Chemistry, “Chromatography,” pp. 116–159, 2010.
 - [76] A. Degani, Q. Cass, and P. Viera, “Cromatografia,” pp. 21–25, 1998.
 - [77] A. Technologies, “HPLC Basics: Fundamentals of liquid Chromatography,” pp. 1–37,

2012.

- [78] R. Chust, "Introdução Cromatografia de Líquidos," *Bol. SPQ*, vol. 39, pp. 43–54, 1990.
- [79] L. Snyder and J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography," pp. 1–522.
- [80] J. Wiley, "Practical High-Performance Liquid Chromatography," 2004, pp. 1–351.
- [81] J. Ermer and H. Miller, "Method Validation in Pharmaceutical Analysis," 2005, pp. 1–403.
- [82] A. Ferreira, "Validação de Métodos Analíticos (1ª parte)," 2016.
- [83] ICH, "Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)," pp. 1–13, 2005.
- [84] A. Ferreira, "Validação de Métodos Analíticos (2ª parte)," 2016.
- [85] M. Nasser, A. Ameri, N. Nayuni, A. Kumar, D. Perrett, A. Tucker, and A. Johnston, "The differences between the branded and generic medicines using solid dosage forms : In-vitro dissolution testing," *Results Pharma Sci.*, vol. 2, pp. 1–8, 2012.
- [86] L. Yang, Y. Shao, and H. Han, "Improved pH-dependent drug release and oral exposure of telmisartan, a poorly soluble drug through the formation of drug-aminoclay complex," 2014.
- [87] P. Tran, H. Tran, and B. Lee, "Modulation of microenvironmental pH and crystallinity of ionizable telmisartan using alkalizers in solid dispersions for controlled release," *J. Control. Release*, vol. 129, no. 1, pp. 59–65, 2008.
- [88] L. Zhong, X. Zhu, B. Yu, and W. Su, "Influence of alkalizers on dissolution properties of telmisartan in solid dispersions prepared by cogrinding," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 40, no. 12, pp. 1660–1669, 2014.
- [89] P. Patel and V. Patravale, "Commercial Telmisartan Tablets: A Comparative Evaluation with Innovator Brand Micardis," vol. 1, no. 8, pp. 282–292, 2010.
- [90] B. Lich, "A comparative evaluation of the quality of ten generic telmisartan tablets with the brand," *African J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 7, no. 29, pp. 2043–2053, 2013.
- [91] V. Pandya and S. Chaudhari, "Optimization and Evaluation of a Formulation Containing Low Soluble Antihypertensive Agent," *Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 5–9, 2012.
- [92] K. Kim, W. Hwang, J. Jung, B. Kim, and G. Kim, "Bioequivalence of Telmi Plus V tablet 80/12.5 mg to Micardis Plus tablet 80/12.5 mg (telmisartan/hydrochlorothiazide 80/12.5 mg)," *J. Pharm. Investig.*, vol. 45, no. 4, pp. 399–406, 2015.